# Die Synthese von Nucleinsäuren auf chemischem Wege

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLFGANG POLLMANN
aus Bielefeld

Tübingen 1962

7139

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549606_0089

# DIE SYNTHESE VON NUCLEINSÄUREN AUF CHEMISCHEM WEGE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Pollmann

aus Bielefeld

Tübingen 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 10.Mai 1962

Dekan: Prof.Dr.K.G.Grell

1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Schramm

2. Berichterstatter: Prof.Dr.E.Müller

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.Gerhard Schramm in der Zeit von Juli 1960 bis Januar 1962 am Max-Planck-Institut für Virusforschung durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.Gerhard Schramm, danke ich recht herzlich für die Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

## Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 4 |
| II. | Theoretischer Teil | |
| | 1.) Darstellung von Apurinsäuren | 8 |
| | 2.) Resynthese von Nucleinsäuren aus Apurinsäuren | 23 |
| | 3.) Darstellung von Nucleosiden | 34 |
| | 4.) Totalsynthese von Nucleinsäuren | 43 |
| III. | Experimenteller Teil | |
| | 1.) Gewinnung der RNS aus Bäckerhefe | 58 |
| | 2.) Darstellung der DNS aus Kalbs-Thymusdrüsen | 59 |
| | 3.) Reinheitsprüfung der Nucleinsäuren | 60 |
| | 4.) Bestimmung der Sedimentationskonstanten und der Diffusionskonstanten | 62 |
| | 5.) Die potentiometrische Titration | 63 |
| | 6.) Messung der Purinabspaltung | 64 |
| | 7.) Darstellung des Polyphosphorsäure-äthylesters | 64 |
| | 8.) Darstellung von Apurinsäure | 65 |
| | 9.) Einbau von $C^{14}$-markierten Basen in Apurinsäure | 66 |
| | 10.) u. 11.) Enzymatische Abbaureaktionen | 67 |

Seite

12. - 15.) Darstellung von Nucleosiden 69

16.) Bestimmung der alkalischen Hyperchromie 72

17. - 21.) Darstellung von Polynucleotiden 73

IV. Zusammenfassung 76

V. Literaturverzeichnis 79

## Die Synthese von Nucleinsäuren auf chemischem Wege

### I. Einleitung

Die Nucleinsäuren sind für die gesamten biochemischen Vorgänge in der Zelle von entscheidender Bedeutung. So stellt die Desoxyribonucleinsäure (DNS) den Träger der Erbeigenschaften dar. Die DNS steuert vom Zellkern aus die Bildung enzymatisch-wirksamer Proteine, wobei verschiedene Typen von Ribonucleinsäuren (RNS) eine wichtige Vermittlerrolle spielen. Bei den Viren kann neben der DNS auch die RNS Träger der Erbeigenschaften sein. Ein Beispiel hierfür ist die infektiöse RNS aus dem Tabak-Mosaik-Virus.

Um die biologische Wirkung der Nucleinsäuren näher untersuchen zu können, ist es wichtig, chemische Reaktionen zur Abwandlung natürlicher Nucleinsäuren zu kennen. Eingehend untersucht wurden hierzu die Reaktionen mit Natriumnitrit und Hydroxylamin (1; 2 und 3). Die so abgewandelten Nucleinsäuren erzeugen entsprechend veränderte Proteine, was durch eine Änderung der biologischen Merkmale zu erkennen ist. Es handelt sich demnach bei den beschriebenen Reaktionen um chemisch erzeugte Mutationen.

Sehr wichtig wäre auch ein Partial- oder Totalsynthese einfacher Nucleinsäuretypen auf chemischem Wege. Diese Substanzen wurden für verschiedene Modellversuche in physikalisch-chemischer und bio-chemischer Hinsicht von großem Nutzen sein.

Auf enzymatischem Wege ist die Synthese von RNS und DNS möglich. A. Kornberg gelang die Darstellung von Desoxyribonucleinsäuren aus den vier Desoxynucleosid-triphosphaten und DNS als Starter. Das DNS-synthetisierende Enzym wurde aus Escherichia coli gewonnen (4). Die Synthese von Ribonucleinsäuren gelang S. Ochoa aus Ribonucleosid-diphosphaten mit Oligo- oder Polynucleotiden als Starter. Das Enzym wurde aus Azotobacter vinelandii isoliert (5). Mit einem Enzym aus Micrococcus lysodeikticus konnte S.B. Weiss Ribonucleinsäuren aus den vier Ribonucleosid-triphosphaten und DNS als Starter darstellen (6; 7;). Analoge Versuche zur Synthese von RNS mit DNS als Starter wurden von A. Stevens (8) und J.D. Weill (9) durchgeführt. Nachteilig bei der enzymatischen Synthese ist, daß die Nucleotide als Di- bzw. Tri-phosphate eingesetzt werden müssen. Die Isolierung der Enzyme ist ferner schwierig.

Auf chemischem Wege konnten bisher nur Oligonucleotide mit einer Kettenlänge von maximal 13 synthetisiert werden. Die Darstellung von Nucleinsäuren war trotz zahlreicher Versuche nicht gelungen.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob eine chemische Synthese einfacher Nucleinsäuren nicht doch möglich ist. Zunächst sollte eine Partialsynthese versucht werden. Es wurde aus natürlichen Nucleinsäuren ein Teil der heterocyclischen Basen vorsichtig abgespalten und versucht, die freien Aldehydgruppen mit andersartigen Basen wieder zu besetzen. Hierzu war es notwendig, die Abspaltungsgeschwindigkeit der Basen und die Spaltungsgeschwindigkeit der Nucleinsäurekette genau zu untersuchen. Anschließend mußte nach geeigneten Kondensationsmitteln gesucht werden, um die freien Aldehydgruppen wieder in N-Glycoside zu verwandeln.

In unserem Institut war es bereits früher gelungen, nach dem Prinzip der Aktivierung durch Phosphorylierung Aminosäuren zu polymerisieren (10). Die erste Stufe der Reaktion besteht in der Aktivierung der Aminogruppe durch die Bildung eines Phosphamidesters. Dieser reagiert mit der Carboxylgruppe der zweiten Aminosäure. Versuche mit verschiedenen Phosphorylierungsmitteln ergaben, daß die Kon-

densation mit Polyphosphorsäure-äthyl-ester besonders günstig verläuft. Es sollte daher versucht werden, die Aktivierung mit Polyphosphorsäure-äthyl-ester (PPE) auch auf die Aldehydgruppe anzuwenden.

Im Laufe der Arbeit zeigte es sich, daß Polyphosphorsäureester hierfür hervorragend geeignet sind. Danach ergab sich die Aufgabe, die Bildung von N-Glycosiden (Nucleoside) auf breiterer Basis zu untersuchen. Geprüft wurde die Synthese aus verschiedenen Zuckern und heterocyclischen Basen mit PPE.

Da sich der Ester bei der Aktivierung der acetalischen Oxygruppen bewährt hatte, tauchte die Idee auf, dieses Reagenz auch zur Aktivierung und Polykondensation von Nucleotiden zu verwenden. Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich daher mit diesem besonders wichtigen Problem der chemischen Total-Synthese von Nucleinsäuren aus Nucleotiden bzw. Nucleosiden.

## II. Darstellung von Apurinsäuren

In den Nucleinsäuren kommen zwei Arten von Bindungen vor, die durch Säuren hydrolysiert werden:
1. die glycosidische Bindung zwischen den Zuckerresten und den Purinbasen und 2. die Phosphorsäurediester-Bindung zwischen den einzelnen Zuckerresten in der Kette (Abb. 1).

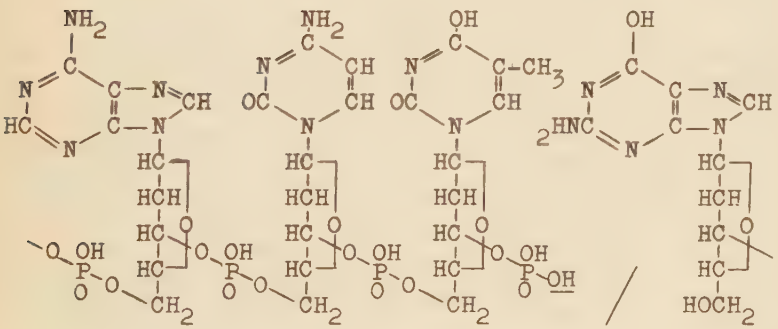


Abb. 1: Ausschnitt aus dem Formelbild der Desoxyribonucleinsäure

Die Stabilität der glycosidischen Bindung ist von der Art der heterocyclischen Base abhängig (11). So erfolgt

die Spaltung bei den Purinen bedeutend leichter als bei den Pyrimidinen und ist ferner von Purin zu Purin etwas verschieden. Die Beständigkeit der N-Glycosid-Bindung ist aber auch von der Art des beteiligten Zuckers abhängig. Bei der Desoxyribonucleinsäure (DNS) erfolgt die Purinabspaltung bedeutend leichter als bei der Ribonucleinsäure (RNS). Aus der DNS können daher die Purinbasen quantitativ abgespalten werden, ohne daß hierbei die hochmolekulare Struktur völlig zerstört wird (12). Diese Hydrolysenprodukte wurden von E. Chargaff als Apurinsäuren bezeichnet (13). Beide Spaltungsmöglichkeiten sind von biologischer Bedeutung. Von E. Freese (14) wurde gezeigt, daß die Entfernung bestimmter Basen aus der DNS zu Mutationen führen kann. Auf der anderen Seite geht aus Untersuchungen an verschiedenen Virus-Ribonucleinsäuren hervor, daß die Hydrolyse der Phosphatbrücken zu einer Inaktivierung der biologischen Funktion führt. So konnte A. Gierer an Tabakmosaikvirus-RNS zeigen, daß bereits bei einer Spaltung innerhalb der Kette die Infektiosität der RNS verloren geht (15).

Es ist daher wichtig, genaue Unterlagen dafür zu besitzen, inwieweit eine Spaltung der glycosidischen Bindung zu den Purinen ohne Kettenbruch möglich ist. Zunächst

wurde die Hydrolysengeschwindigkeit der Phosphorsäurediester-Gruppen zu den sek. Phosphaten und die Hydrolysen-Geschwindigkeit der glycosidischen Bindung zu den Purinen bei Hefe-RNS und Thymus-DNS und bei verschiedenen pH-Werten quantitativ bestimmt. Die Möglichkeit zur Herstellung von Apurinsäuren hängt von dem Verhältnis dieser beiden Reaktionskonstanten ab.

Messung der Hydrolysenkonstanten der Phosphorsäurediester-Bindung in den Nucleinsäuren

Zur quantitativen Bestimmung der Kettenspaltung innerhalb des Nucleinsäurestranges durch Säuren oder Enzyme wurde ein potentiometrisches Titrationsverfahren ausgearbeitet, das die Bestimmung auch kleiner Spaltungswerte gestattet (16). Hierbei wurde die je Spaltung der Nucleinsäure entstehende sek. Phosphatgruppe (Abb. 1) mit n/100 - NaOH titriert.

An Modellsubstanzen mußte zunächst das genaue Titrationsintervall und der pK-Wert der sek. Phosphatgruppe bestimmt werden. Es wurden hierzu einmal das in seiner Zusammensetzung der Hefe-RNS entsprechende Phosphorsäuremonoestergemisch: Adenylsäure, Guanylsäure, Cytidylsäure

und Uridylsäure und einmal das phosphatfreie Nucleosidgemisch: Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin titriert. Die gefundenen Titrationskurven sind in der Abb. 2 dargestellt.

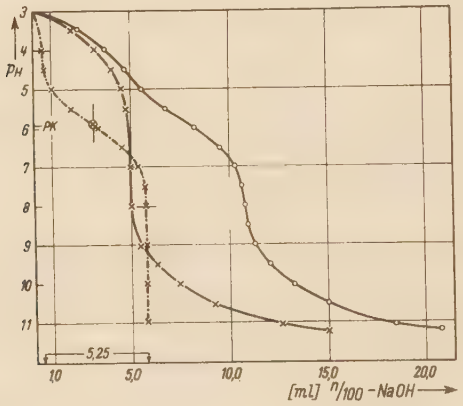



Abb. 2: o——o Nucleotid-Kurve;

x——x Nucleosid-Kurve bezogen auf 16 mg Hefe-RNS

x_ · _ x Phosphatkurve

Die beiden Substanzgemische unterscheiden sich nur durch die Phosphatreste. Bei einer ungestörten Titration ist daher als Differenz der beiden Kurven die Dissoziations-

kurve der Phosphatgruppe zu erwarten. Wie die Abb. 2 zeigt, ist dieses der Fall. Trägt man die pH-Wertänderungen $\Delta$ pH gegen die Menge an verbrauchter Natronlauge auf, so erhält man sehr genau die Anfangs- und Endpunkte des Titrationsintervalls der sek. Phosphatgruppe. Die Modelltitrationen ergaben dabei die Werte pH 4,00 und pH 8,05; der pK-Wert betrug 6,0. Der Verbrauch an Natronlauge entsprach der theoretisch zu erwartenden Menge. Aus der Titrationskurve des Nucleosidgemisches folgt, daß im Dissoziationsbereich der sek. Phosphatgruppe praktisch keine anderen dissoziationsfähigen Gruppen liegen.

Die Brauchbarkeit der Titrationsmethode wurde am Verlauf enzymatischer Hydrolysen geprüft. Zum Beispiel wurde die Einwirkung von Tabakdiesterase und Pankreas-RNase auf Hefe-RNS und von DNase I auf Thymus-DNS näher untersucht (16). Die Enzyme und Nucleinsäuren sind im experimentellen Teil ausführlich beschrieben. In allen Fällen gab die Differenzkurve aus der Titration des Hydrolysates und des äquivalenten Nucleosidgemisches direkt die Menge an sek. Phosphatgruppen und damit die genaue Spaltungsrate an.

Nachdem die Brauchbarkeit der Methode gesichert war, wurde titrimetrisch die Säurehydrolyse von RNS und DNS im

pH-Bereich von 1,80 - 2,40 untersucht. Die Nucleinsäurelösungen wurden hierzu bei 37° C mit einem Autotitrator auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt und Zeitproben anschließend titriert. Das Wachstum von Mikroorganismen wurde durch Zugabe von wenig Chloroform verhindert. Allgemein wurden am Autotitrator halbe pH-Wertschritte eingestellt und die verbrauchte Menge an Natronlauge an der Feinbürette abgelesen.

In der Abb. 3 ist die Zunahme der sek. Phosphatgruppen im logarithmischen Maßstab aufgetragen.

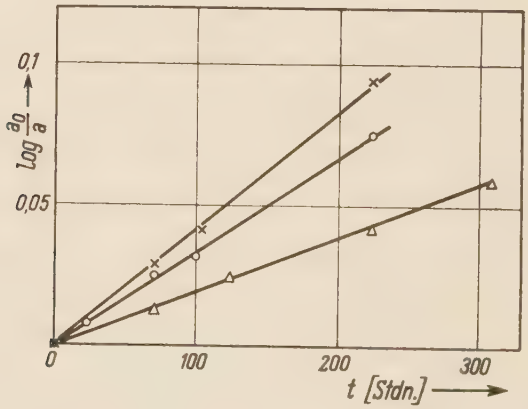



Abb. 3: Säurespaltung der Phosphatbrücken in der Hefe-RNS bei 37° C; pH 1,80 x; pH 2,00 o; pH 2,40 Δ

Der geradlinige Verlauf entspricht einer monomolekularen Reaktion. Die aus der Steigung der Geraden nach der Gleichung $\log a_o/a_t = k/2{,}30 \times t$ errechneten Hydrolysekonstanten k sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Hierbei bedeuten $a_o$ und $a_t$ die Konzentrationen an ungespaltenen Ketten zu Beginn der Hydrolyse und nach der Zeit t.

Tabelle 1

| $p_H$ | RNS | | | | DNS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $K_{Phosphat}$ in $10^{-6}$ $min^{-1}$ | $K_{Ph}/(H^{\oplus})$ in $10^{-3}$ | $K_{Purin}$ in $10^{-6}$ $min^{-1}$ | $K_{Purin}/(H^{\oplus})$ in $10^{-4}$ | $K_{Phosphat}$ in $10^{-6}$ $min^{-1}$ | $K_{Purin}$ in $10^{-6}$ $min^{-1}$ |
| 2,4 | 6,4 | 1,6 | 1,2 | 3,0 | 6,6 | 780 |
| 2.0 | 12,7 | 1,3 | 2,7 | 2,7 | — | — |
| 1,8 | 15,8 | 1,1 | 3,2 | 3,2 | — | — |

Hydrolysekonstanten der Purin- und Phosphorsäurediester-Spaltung bei RNS und DNS, gemessen bei 37° C.

Man erkennt, daß die Hydrolysegeschwindigkeiten der Wasserstoffionen-Konzentration annähernd proportional sind.

Bemerkenswert ist, daß die Phosphorsäure-diester-Bindungen bei der DNS etwa gleich schnell hydrolysiert werden wie bei der RNS. Für die Stabilität der Phosphorsäureester-Bindung spielt demnach die α-ständige Oxygruppe keine entscheidende Rolle. Da allgemein unter der katalytischen Wirkung von Mineralsäuren die Ester primärer Alkohole schneller hydrolysiert werden als die von sekundären, erfolgt die Spaltung der Nucleinsäure im sauren nur zwischen der Phosphatgruppe und der primären Oxygruppe am $C_5'$ (s. Abb. 1). Der entstehende $C_3'$-Phosphorsäuremonoester ist gegen eine weitere Säurehydrolyse bedeutend stabiler.

Bestimmung der Purinabspaltung

Es wurde zunächst versucht, die säurekatalysierte Basenabspaltung aus der Änderung der Ultra-Violett-Absorptionskurve oder dem atomaren N/P-Verhältnis quantitativ zu bestimmen. Auch die jodometrische Titration der durch die Basenabspaltung entstandenen Aldehydgruppen nach M. Macleod und R. Robinson (17) wurde auf seine Brauchbarkeit hin untersucht. Als Versuchsbeispiel sind in der Abb. 4 die Extinktionskurven von Thymus-DNS bei fortschreitender Basenabspaltung dargestellt.

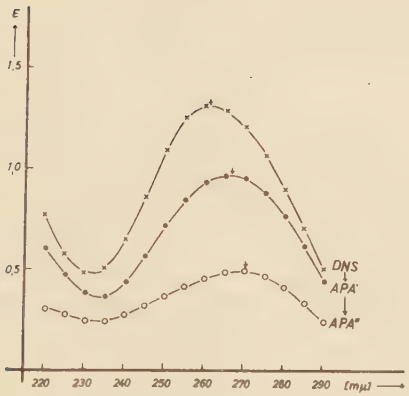



Abb. 4
UV-Ektinktionskurven im Verlaufe der Basenabspaltung bei Thymus-DNS; APA': nach 24-,APA'': nach 48 Stdn.Hydrolyse.

Die Nucleinsäurelösung wurde dabei auf 37° C und pH 2,40 gehalten. Nach 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Diese wurden darauf mit Wasser soweit verdünnt, daß ihr Phosphatgehalt dem der ursprünglichen DNS-Lösung entsprach. Wie die Absorptionskurven der Abb. 4 zeigen, fällt mit fortschreitender Basenabspaltung die Molextinktion, bezogen auf Phosphor; gleichzeitig sinkt das atomare N/P-Verhältnis von ursprünglich 4,1 auf 2,8 nach 24 Stunden Hydrolyse und auf 2,2 nach 48 Stunden Hydrolyse. Bei der jodo-

metrischen Bestimmung der Aldehydgruppen ergaben sich folgende Werte in Prozent des Gesamtzuckers: Zu Beginn der Säureeinwirkung 0 %, nach 24 Stunden 37 % und nach 48 Stunden 47 %.

Die Befunde zeigen eindeutig, daß Basen bei der Säureeinwirkung abgespalten werden. Das Auftreten der Aldehydgruppen ist ferner ein Beweis dafür, daß die Abspaltung durch Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung Base-Ribose erfolgt. Da das Absorptionsmaximum sich während der Basenabspaltung nach längeren Wellenlängen hin verschiebt, müssen hauptsächlich die Purinbasen abgespalten werden; ihr Absorptionsmaximum liegt im Vergleich zu den Pyrimidinen bei kürzeren Wellenlängen. Es gilt für die Desoxyadenylsäure 258 mμ, Desoxy-guanylsäure 255 mμ, Desoxycytidylsäure 280 mμ und Thymidylsäure 267 mμ.

Für die quantitative Bestimmung der Glycosidspaltung erwiesen sich aber diese Methoden als ungeeignet. Die Bestimmung der Absorptionskurven ist zwar wie alle Ultra-Violett-Extinktionsmessungen bei den Nucleinsäuren sehr genau, eine quantitative Bestimmung der Basenabspaltung ist aber hieraus nicht möglich, da die Art der abgespaltenen Basen nicht bekannt ist und jede eine andere Molextinktion besitzt. Hinzu kommt, daß die Molextinktion der

Basen von Nachbargruppen beeinflußt wird; in der Nucleinsäure also einen geringeren Wert besitzt als im ungebundenen Zustand. Der hierdurch bedingte Anstieg der UV-Extinktion bei der Spaltung der Nucleinsäuren in Mononucleotide wird als Hyperchromie bezeichnet. Die quantitative Bestimmung der Basenabspaltung aus dem atomaren N/P-Verhältnis und aus der Menge an titrierten Aldehydgruppen scheidet wegen der zu geringen Empfindlichkeit der Methoden aus. Auch lassen diese Bestimmungen keinen Schluß auf die Art und Zusammensetzung der abgespaltenen Basen zu.

Zur Bestimmung der Hydrolysenkonstanten wurden daher die abgespaltenen Basen direkt chromatographisch charakterisiert und durch Elution der Banden und Extinktionsmessungen im Ultra-Violett quantitativ bestimmt.

In den gleichen Ansätzen, in denen die Phosphorsäurediester-Hydrolyse gemessen worden war, wurde anschließend die säurekatalysierte Abspaltung der Purinbasen bestimmt. Die zur Bestimmung der Phosphatspaltung titrierten Zeitproben wurden gefriergetrocknet, in Wasser aufgenommen und chromatographiert. Der Vergleich der $R_f$-Werte und der Ultra-Violett-Absorptionskurven der gefundenen Banden mit den Purin- und Pyrimidinbasen ergab, daß unter den Reaktionsbedingungen nur Purine abgespalten werden. In den Abb. 5

und 6 sind zwei Beispiele für die Purinabspaltung aus Hefe-RNS bei pH 2,40 und pH 1,80 dargestellt.

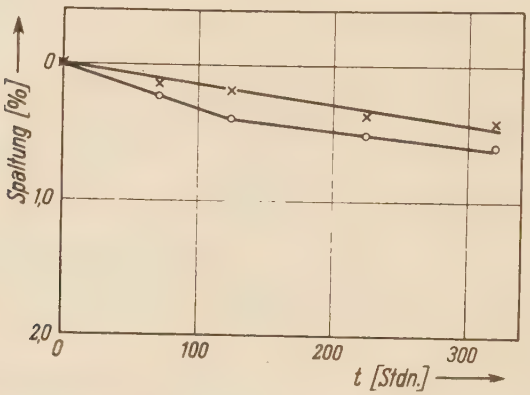



Abb. 5: Basenabspaltung bei Hefe-RNS, 37° C, pH 2,40; Adenin x; Guanin o

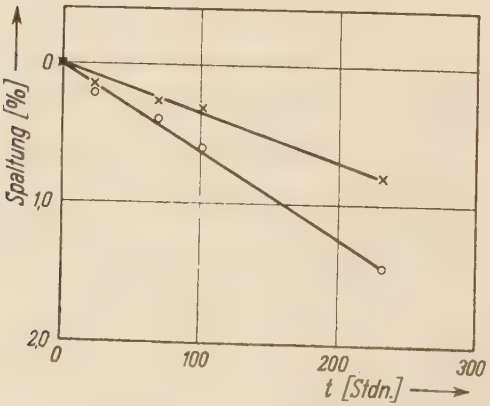



Abb. 6: Basenabspaltung bei Hefe-RNS, 37° C, pH 1,80; Adenin x; Guanin o

Wie die Kurven zeigen, sind nach 100 Stunden erst 1 % aller Purine abgespalten. Eine Bestimmung der hierbei entstandenen Aldehydgruppen durch die Jodtitration wäre unmöglich gewesen. Bei der RNS erfolgt die Abspaltung des Guanins bei pH 1,80 etwa doppelt so schnell als die des Adenins. Bei pH 2,40 sinkt dagegen die Hydrolysegeschwindigkeit des Guanins im Verlaufe der Reaktion auf den Wert des Adenins. Bei der DNS sind die Hydrolysegeschwindigkeiten der beiden Purine gleich. Die Hydrolysekonstanten für die Summe der Purine Adenin und Guanin sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Hydrolysekonstanten der Purin- und Phosphorsäurediester-Spaltung gehen nicht streng proportional, sondern symbat mit der Wasserstoffionen-Konzentration. Besonders auffallend ist, daß die Hydrolysekonstante der Purine bei der DNS etwa 650 mal höher als bei der RNS ist. Im Gegensatz zur Phosphorsäurediester-Spaltung übt hier die Oxygruppe am $C_2'$-Atom einen starken Einfluß auf die N-glycosidische Bindung aus.

Da sowohl die Kettenspaltung als auch die Purinabspaltung in gleicher Weise von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt, ist die Ausbeute an Apurinsäuren unabhängig vom pH-Wert. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten

von der Protonenkonzentration spricht dafür, daß die Anlagerung eines Protons der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Diese erfolgt um so langsamer, je elektropositiver der Angriffsort ist. Aus diesem Grunde stabilisiert die elektrophile Oxygruppe am $C_2'$-Atom der Ribose die Glycosidbindung. Da bei der DNS dieser stabilisierende Einfluß fehlt, gelingt hier die Darstellung einer Apurinsäure sehr viel leichter als bei der RNS. Trotzdem besteht auch bei der RNS die Möglichkeit, intakte Moleküle zu erhalten, die einen Purinrest verloren haben. Der Anteil der Ketten, die nach der Zeit t noch keine Phosphorsäurediester-Spaltung, jedoch eine Purinabspaltung erlitten haben, ist

$$M_{\text{Apurinsäure}} = e^{-N_1 \cdot \alpha \cdot t} \times (1 - e^{-N_2 \cdot \beta \cdot t}) \qquad (1)$$

$N_1$ = Zahl der Phosphatbrücken = Zahl der Kettenglieder

$\alpha = k_{\text{Phosphat}}$ ; $\beta = k_{\text{Purin}}$ ;

$N_2$ = Zahl der Purinreste

Das Maximum dieser Funktion ist $t_{max} = \ln \frac{N_1 \cdot \alpha + N_2 \cdot \beta}{N_1 \cdot \alpha} : N_2 \cdot \beta$

Für die RNS aus Tabakmosaikvirus gelten zum Beispiel folgende Werte: $N_1 = 6400$; $N_2 = 3200$. Bei einem pH von 2,4 und 37° C ist dann $t_{max} = 25$ min. Durch Einsetzen dieses Wertes in die Gleichung (1) erhält man den maximalen Anteil an Apurinsäure zu $M_A = 3{,}6$ %. Zu dem Zeitpunkt $t_{max}$

ist die Zahl der noch vollkommen intakten Moleküle, die weder eine Ketten- noch eine Purinspaltung erlitten haben, 33 % und die Zahl der bereits gespaltenen Moleküle 63,4 %.

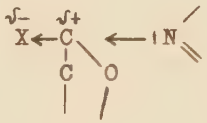
Infolge der schnelleren Purinabspaltung und des höheren Molekulargewichtes verkürzt sich bei der DNS $t_{max}$ erheblich. Wie die Versuche zeigten, ist es hier verhältnismäßig leicht, ungespaltene Ketten zu erhalten, die mehrere Purinbasen verloren haben.

Resynthese von Nucleinsäuren aus Apurinsäuren

Nachdem die experimentellen Voraussetzungen für die Darstellung der Apurinsäuren geklärt waren, wurde nun versucht, die entstandenen Aldehydgruppen wieder mit einer heterocyclischen Base zu den entsprechenden N-Glycosiden umzusetzen. Es sollte also versucht werden, aus den Apurinsäuren neue Nucleinsäuren zu synthetisieren. Für den Wiedereinbau der Basen kam hauptsächlich folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. Die säurekatalysierte Synthese: Diese stellt die direkte Umkehrung der Apurinsäuredarstellung dar. Unter dem Einfluß katalytischer Mengen Mineralsäure findet eine Anlagerung stickstoffhaltiger Verbindungen an die Carbonylgruppe der Zuckerkomponente statt. (18). Es war jedoch zu erwarten, daß bei den stickstoffhaltigen Heterocyclen das Gleichgewicht sehr stark auf der Seite des Zerfalls liegt. Entsprechende Befunde ergaben sich bei den eigenen Versuchen (s.S.28 ). 2. Aktivierung der acetalischen Oxygruppe: Bei diesem allgemein angewandten Verfahren wird nach dem Schützen der OH-Gruppen die Aldehydgruppe des Zuckers in das $C_1'$-Halid überführt und mit den HgCl-bzw. Ag-Salzen der Basen umgesetzt. Von vielen heterocyclischen Basen sind allerdings diese Salze nur schwer oder gar nicht darstellbar. Auch sind die Halide der Desoxyzucker sehr labil. H. Venner (19) erreichte bei der Synthese von

2'-Desoxy-adenosin eine Gesamtausbeute von weniger als 1 %. Hinzu kommt, daß eine Halogenierung der Apurinsäuren ohne Nebenreaktionen an den noch vorhandenen Basen kaum durchführbar ist. (Übersicht A.M. Michelson (20)). Es mußte daher nach einer anderen Möglichkeit zur Aktivierung der Acetalgruppe gesucht werden. Allgemein kann diese dadurch erreicht werden, daß die acetalische Oxygruppe durch einen elektrophilen Rest X substituiert wird. Die hierdurch bedingte partielle positive Ladung am $C_1$-Atom erleichtert den nucleophilen Angriff des N-Atoms der heterocyclischen Base.



In der Zelle wird als elektrophile Gruppe meist der Phosphatrest verwandt. So verlaufen fast alle OH-Substitutionen in der Zelle über die Phosphate. Beispiele hierfür sind die Reaktionen 1; 2 und 3 in der Tabelle 2. Auf diesem Wege kann nicht nur die OH-Gruppe am C-Atom, sondern auch, wie die Gleichungen 4 und 5 zeigen, eine OH-Gruppe des Phosphatrestes aktiviert werden.

Tabelle 2

1. Ribose-1-phosphat + Uracil $\xrightarrow{\text{Uridinphosphorylase}}$ Uridin + Phosphat

2. 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat + Adenin $\xrightarrow{\text{Nucleotidpyrophosphorylase}}$ Adenylsäure + Pyrophosphat

3. Glucose-1-phosphat $\xrightarrow{\text{Phosphorylase}}$ Glycogen + Phosphat

4. Nucleosid-diphosphat $\xrightarrow{\text{Polynucleotidphosphorylase}}$ RNS + Phosphat

5. Desoxynucleosid-triphosphat $\xrightarrow{\text{Polynucleotidpyrophosphoryl.}}$ DNS + Pyrophosphat

Bedeutung der Phosphatbindung bei biochemischen Synthesen.

Als geeignetes Aktivierungsmittel zur Kondensation von Aminosäuren zur Polypeptiden hatte sich bereits in unserem Institut Polyphosphorsäure-äthylester (PPE) bewährt (10). Um zu prüfen, ob PPE mit der Aldehydgruppe der Zucker reagiert, wurden mehrere Vorversuche durchgeführt: Zu einer Lösung von D-Ribose in Formamid wurde etwas Fuchsinschweflige-Lösung (Schiffsches Reagenz auf Aldehydgruppen) gegeben. Es trat eine intensive Rotfärbung ein. Die gleiche Menge an Ribose ergab nach der Zugabe von PPE nur eine schwache Farbreaktion, während bei einem Vergleichsansatz mit $NaH_2PO_4$ die volle Rotfärbung eintrat. Wurden die drei Ansätze nachträglich mit dem gleichen Volumen Wasser ver-

setzt, so erreichte die PPE-Probe bald die Farbintensität der beiden Vergleichslösungen. Auch beim Erwärmen der Ribose mit PPE in Formamid blieb die Aldehydfarbreaktion schwach positiv. Diese Vorversuche machen also eine Reaktion der Aldehydgruppe mit PPE sehr wahrscheinlich. Durch Wasser wird das Reaktionsprodukt langsam hydrolysiert, wobei die Aldehydgruppe wieder auftritt. Saure Phosphatsalze beeinflussen die Farbreaktion nicht.

Auffallend war beim Erwärmen der Probe mit PPE ein deutlicher Blausäuregeruch. Weitere Versuche ergaben, daß die Blausäure durch eine Dehydratisierung des Formamids durch den PP-Ester entsteht. Für die weiteren Versuche wurde daher Dimethylformamid als Lösungsmittel verwandt.

Eine Apurinsäurelösung aus Thymus-DNS zeigte die gleichen Reaktionen mit PPE und Schiffs-Reagenz wie die Ribose. Bei einem Vergleichsansatz mit Formaldehyd statt Ribose waren dagegen die Farbintensitäten mit und ohne PPE gleich, da in diesem Falle der Ester nicht mit der Aldehydgruppe des Formaldehyds reagiert. Der PP-Ester greift also den gebildeten Farbstoff nicht an.

Die beschriebenen Vorversuche machten eine Blockierung der Aldehydgruppe durch PPE sehr wahrscheinlich. Der Beweis hierfür konnte durch die Jodtitration der Aldehydgruppen nach Macleod u. Robinson (17) erbracht werden.

Als Ausgangsmaterial diente eine Apurinsäure aus Thymus-DNS, bei der 47 % der 2'-Desoxyribose durch die Purinabspaltung freie Aldehydgruppen aufwies. Charakterisiert wurde die DNS durch ihr Molekulargewicht, Proteingehalt, atomares N/P-Verhältnis und Viskositätszahl.

Die hieraus dargestellte wässrige Apurinsäure-Lösung wurde durch Dialyse gegen Dimethylformamid in dieses Medium überführt.

Zu dieser Lösung wurde darauf ein etwa 20-molarer Überschuß an PPE gegeben und Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden in eine $NaHCO_3$-Lösung gegossen und jodometrisch die Aldehydgruppen bestimmt. Bereits nach etwa 5 Minuten bei Zimmertemperatur waren diese nicht mehr nachweisbar. Wurden die Zeitproben dagegen in Wasser gegossen (saure Reaktion durch Zersetzung des PP-Esters), so konnten 70 - 90 % der ursprünglichen Aldehydgruppen wieder titriert werden. Das Reaktionsprodukt Aldehyd-PPE muß demnach gegen Alkali stabil, gegen Säure aber labil sein. Daß die Blockierung der Aldehydfunktion durch eine Phosphorylierung erfolgt, konnte bei einem analogen Ansatz mit D-Glucose anstelle der Apurinsäure durch die Isolierung von Glucose-1-phosphat bewiesen werden (s. "Darstellung von Nucleosiden").

Nachdem die Phosphorylierung der Aldehydgruppe durch PPE bewiesen war, wurde versucht, die so aktivierte Zuckerkomponente mit einer heterocyclischen Base zu einem N-Glycosid umzusetzen. Als Zuckerkomponente wurde für die Versuche die bereits erwähnte Apurinsäure aus Thymus-DNS in Dimethylformamid, als heterocyclische Base $C^{14}$-markiertes Adenin verwandt, um die Einbaurate bequem und genau messen zu können. Als Vergleich diente jeweils ein Ansatz, der statt des PP-Esters eine gleiche Menge an Phosphorsäure bzw. Phosphat enthielt. Durch einen einmaligen Kontrollversuch mußte ferner untersucht werden, ob radioaktiv-markiertes Adenin an evt. gebildete nicht-dialysable Hydrolyseprodukte des PP-Esters (z.B. Polyphosphate) adsorbiert wurde. Wie die Messungen ergaben, ist dieses nicht der Fall.

Die gefundenen Aktivitätswerte der Ansätze mit PPE und der Vergleichsansätze mit $H_3PO_4$ sind in der Tabelle 3 zusammengestellt. Ferner sind die Reaktionsbedingungen und die prozentualen Einbauraten der Versuchsansätze mit PPE und der Vergleichsansätze mit $H_3PO_4$ angeführt. Da die Aktivität des Blindwertes weniger als 1/4 des Versuchswertes beträgt, findet ein echter Einbau statt. Auffallend ist aber die Parallelität der Blindwerte mit den Versuchswerten. Dieser Umstand spricht für einen geringen säurekatalysierten ($H_3PO_4$) Adenineinbau (s.o. "Die säurekatalysierte Synthese").

Tabelle 3

| mg Base | mg Apurinsäure | 5 - 20 ml Lösungsmittel | µC/mg Base Aktivität | °C Temperatur | h Zeit | Imp./min.-Strahlungsnullwert Kontrolle $H_3PO_4$ | Imp./min.-Strahlungsnullwert Versuch PPE | Baseneinbau % Kontrolle $H_3PO_4$ | Baseneinbau % Versuch PPE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Adenin 10 | 5 | 40% $H_2O$ + 60% Formamid | 1 : 20 | 20 | 24 | 273 | 624 | ~1 | ~2 |
| Adenin 40 | 5 | Formamid | 1 : 20 | 20 | 24 | 975 | 4227 | 2 | 8 |
| Adenin 40 | 5 | Dimethylformamid | 1 : 20 | 20 | 24 | 4470 | 14925 | 8 | 30 |
| Adenin 160 | 10 | Dimethylformamid | 1 : 20 | 37 | 24 | 9860 | 99846 | 10 | 100 |
| Thymin 160 | 9 | Dimethylformamid | 1 : 16 | 20 | 24 | 59 | 439 | ~0,2 | ~1 |
| Thymin 160 | 10 | Dimethylformamid | 1 : 16 | 37 | 48 | 197 | 1135 | 1 | 2 |
| Guanin 10 | 10 | Dimethylformamid | 1 : 20 | 37 | 24 | 2984 | 32446 | 3 | 30 |
| Uracil 40 | 10 | Dimethylformamid | 1 : 20 | 37 | 48 | 588 | 6104 | 1 | 8 |

Die in der Tabelle 3 angegebenen Daten machen einen glycosidischen Einbau von Heterocyclen in Apurinsäuren sehr wahrscheinlich. Ein direkter Beweis hierfür läßt sich aber durch einen Abbau des Resyntheseproduktes zu definierten $C^{14}$-markierten Bruchstücken erbringen. Dieser Abbau ist auch zur Konstitutionsermittlung notwendig.

Die ersten Versuche wurden mit einer Apurinsäure durchgeführt, in der die freien Aldehydgruppen nur zum Teil durch markiertes Adenin besetzt waren. Durch 30 min Kochen mit $K_2CO_3$ gelingt es durch ß-Elimination (21) die Phosphatbrücke neben den noch vorhandenen Aldehydgruppen abzuspalten (Abb. 7) und diese Bruchstücke mit Schlangengift-Diesterase weiter zu hydrolysieren.

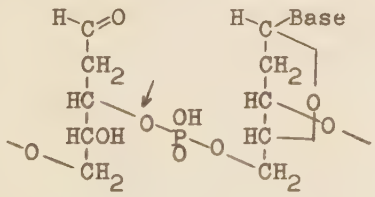



Abb. 7

Dieses Enzym ist sehr unspezifisch und spaltet weitgehend alle 3'-5'-Bindungen innerhalb einer Polynucleotidkette. Hierbei entstehen die Nucleosid-5'-phosphate. Da das Handelspräparat noch eine 5'-Nucleotidase enthält, werden

die 5'-Phosphate weiter zu den entsprechenden Nucleosiden gespalten (22). Im Gegensatz zur Schlangengift-Diesterase ist die Wirkung der Desoxyribonuclease (DNase) spezifischer. Dieses Enzym spaltet nur die 3'-5'-Bindungen innerhalb einer Poly-desoxynucleotidkette. Hierbei wird im Durchschnitt nur jede vierte Bindung in der DNS gespalten (23). Das Enzym Pankras-Ribonuclease (RNase) greift nur 3'-5'-Bindungen innerhalb einer Poly-ribonucleotidkette an. Hierbei werden nur die Bindungen zwischen Pyrimidin-3'-phosphat und $C_5'$ des nächsten Nucleotids (Abb. 1) gespalten (24).

Es traten dabei radioaktiv-markierte, im Chromatogramm wandernde Bruchstücke auf, die sich nach den $R_f$-Werten wie Oligonucleotide verhielten. Das Adenin ist daher an der Apurinsäure nicht adsorptiv, sondern kovalent gebunden.

Falls der Wiedereinbau in ß-Stellung am $N_9$ des Adenins erfolgt, müßte bei der vollständigen Spaltung der Nucleinsäure in ihre Bausteine $C^{14}$-markierte Desoxy-adenylsäure bzw. Desoxy-adenosin auftreten. Dieser Konstitutionsbeweis wurde aber erst möglich, nachdem die vollständige Resynthese der Apurinsäure zu einer neuen Nucleinsäure gelang. Bei einer Temperatur von 37° C und 24 Stunden gelang es, 94 % der freien Aldehydgruppen wieder mit markiertem Adenin zu besetzen (s. Tabelle 3). Diese synthe-

tische DNS wurde im Gegensatz zur teilweise resynthetisierten Apurinsäure von einer $K_2CO_3$-Lösung nicht mehr gespalten. Dagegen konnte dieses Produkt nun mit dem Enzym Desoxyribonuclease abgebaut werden. Bei einer Enzymkonzentration von etwa 1,3 µg/ml;37° C und einer 0,06 %igen DNS-Lösung war die Viskositätszahl nach ca. 2 Stunden von $10^3$ auf 35 gefallen. Die Hydrolyse verläuft demnach etwas langsamer als bei einer natürlichen DNS (25). Wie die viskosimetrischen und chromatographischen Messungen ergaben, wird die DNS durch das Enzym aber nicht vollständig hydrolysiert. Daher wurde das DNS-Hydrolysat mit Schlangengift-Diesterase nachbehandelt.

Durch Papierchromatographie wurde aus dem Hydrolysat eine $C^{14}$-markierte Hauptbande isoliert, die sich chromatographisch in verschiedenen Systemen wie Desoxy-adenosin verhielt. Die Ultraviolett-Absorptionskurve der Bande stimmte mit der von natürlichem Desoxy-adenosin überein.
Daneben wurde eine schwache $C^{14}$-markierte Bande isoliert. Ihre Aktivität war etwa 15 mal schwächer als die der Hauptbande. Chromatographisch verhielt sich diese Substanz in den verschiedenen Systemen wie Adenin.

Das Extinktionsmaximum bei 260 mµ zeigt, daß die N-Glycosidbindung bei der Synthese mit PPE am $N_9$ des Adenins erfolgt. Die nur synthetisch zugänglichen $N_7$-Glycoside des Adenins

haben ein Absorptionsmaximum bei 270 mμ (26). Ein intermediärer Angriff der primären Aminogruppe des Adenins ist wahrscheinlich, jedoch werden diese Reaktionsprodukte, wie alle Schiffschen Basen, durch Säuren leicht wieder hydrolysiert. Da die Reaktionsansätze in Wasser gelöst werden und hierbei durch die Hydrolyse des PP-Esters Phosphorsäure entsteht, ist es verständlich, daß keine Reaktionsprodukte der primären Aminogruppe isoliert werden.

Außer mit Adenin wurden Einbauversuche mit $C^{14}$-markiertem Thymin, Guanin und Uracil durchgeführt. Die gefundenen Daten sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Hierbei werden die Purine bedeutend besser eingebaut als die Pyrimidine. Innerhalb der Purine wird Guanin wegen seiner geringeren Löslichkeit weniger gut als Adenin eingebaut.

Die gefundenen Reaktionen ermöglichen durch die verschiedenen Substitutionen der Basen definierte Abwandlungen an Nucleinsäuren. Handelt es sich dabei um eine genetische DNS, so muß der Basenaustausch zu gezielten Mutanten führen. Eine weitere allgemeinere Möglichkeit der Reaktion liegt auf den Gebieten der Nucleosid-Synthese.

Darstellung von Nucleosiden

Nachdem die Synthese von DNS aus Apurinsäure mit PPE gelungen war, wurde die Aktivierung der Zucker und ihre Umsetzung mit verschiedenen Reaktionspartnern auf breiter Basis untersucht. Diese Versuche erfolgten gemeinsam mit Herrn Dr. H. Grötsch.

Zunächst wurden Modellversuche mit D-Glucose und PPE in Dimethylformamid durchgeführt. Wie bei der Apurinsäure waren nach etwa 20-30 Minuten bei Zimmertemperatur keine Aldehydgruppen mehr jodometrisch nachweisbar. Aus Ansätzen im Eisbad bei $0^{\circ}$ C gelang die Isolierung von Glucose-1-phosphat als Ba-Salz. Charakterisiert wurde die Verbindung durch Papierchromatographie in Pyridin/Butanol/$H_2O$ (1:3:1). In diesem System laufen Glucose-6-phosphat und Glucose-1,6-diphosphat eindeutig verschieden. Da die Perjodattitration nach E.L. Jackson (27) einen Verbrauch von etwa 2 Mol ergab, kann eine Phosphorylierung am $C_2'$ , $C_3'$ oder $C_4'$ nicht erfolgt sein. Das Fehlen der Aldehydfunktion und der gefundene Phosphatgehalt bestätigen das Vorliegen von Glucose-1-phosphat.

Hierauf wurde untersucht, ob die Zucker-1-phosphate die aktive Zwischenverbindung darstellen. Versuche, mit Zucker-1-phosphaten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen Nucleoside oder Polysaccharide darzustellen, verliefen aber

negativ. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem aktivierten Zucker um den Äthylester des 1'-Mono- oder 1'-Polyphosphates.

Bei der Aufarbeitung des Vorversuches mit Glucose und PPE in Dimethylformamid traten neben geringen Mengen an Glucose und dem beschriebenen Glucose-1'-phosphat noch mehrere langsam wandernde Banden auf. Eine nähere Untersuchung der Substanzen ergab (H. Grötsch), daß es sich dabei um Oligoglucoside handelt. Bei Reaktionstemperaturen von 30-60° C gelang es darüber hinaus H. Grötsch, aus verschiedenen Zuckern weitgehend geradkettige Polysaccharide zu synthetisieren (28).

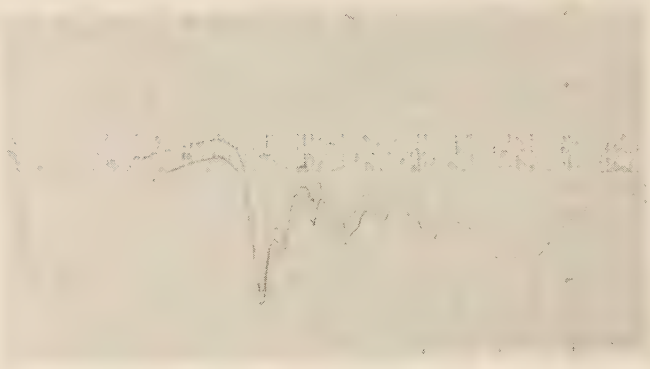
Bei meinen Versuchen zur Darstellung von Nucleosiden mußte ich daher darauf achten, daß die Zuckerkomponente nicht durch Selbstkondensation zu Polysacchariden für die Nucleosidsynthese verloren geht. Aus diesem Grunde wurde in Umkehrung des Zieglerschen Verdünnungsprozesses der in Dimethylformamid gelöste Zucker langsam unter Rühren zu einer Dimethylformamid-Lösung gegeben, die PPE und die heterocyclische Base im Überschuß enthielt. Nach etwa 20 Stunden bei 50-55° C wurde die Reaktionslösung in das gleiche Volumen Wasser gegeben und neutralisiert. Hierbei fiel ein großer Teil der nicht-umgesetzten Base wieder aus. Die weitere Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen : 1. durch eine fraktionierte Kristallisation, da die Löslichkeit der Nucleoside in Wasser bedeutend höher ist als die der freien Basen; 2. durch Säulenchromatographie über eine Dowex-1-formia

X 10-Säule bei pH 11,0 mit Hilfe eines Fraktionssammlers (29).

Bei Ansätzen mit Adenin als Base und D-Ribose als Zucker konnte auf diese Weise ein Nucleosid isoliert werden, das sich bei der Säulenchromatographie wie natürliches Adenosin verhielt. Durch Säure ließ sich die Substanz in Adenin und Ribose spalten. Es handelt sich also um ein Adeninribosid. Zur weiteren Identifizierung wurde die Substanz papierchromatographisch in verschiedenen Systemen mit natürlichem Adenosin (9-N-(1'-ß-ribosyl)-Adenin) verglichen. Es trat nur eine einheitliche Bande auf, deren $R_f$-Werte mit denen des Adenosins völlig übereinstimmten. Lokalisiert wurde die Bande auf dem Chromatogramm durch ihre Absorption im UV-Licht. Die Ultraviolett-Absorptionskurve der neuen Substanz stimmte mit der von Adenosin gut überein. Wie bereits erwähnt wurde, kann hieraus eindeutig auf das Vorliegen der natürlichen $N_9$-glycosidischen Bindung geschlossen werden. Als letzter Beweis für die Identität des synthetisierten Nucleosids mit Adenosin wurde das Infrarot-Spektrum im Leitz-Spektrograph in festem KBr aufgenommen. Hierzu wurde das natürliche Adenosin den gleichen Aufarbeitungsschritten unterworfen wie das Syntheseprodukt, beide Proben über $P_2O_5$ im Vakuumexsikkator getrocknet und mit KBr gepreßt. Die beiden Infrarot-Spektren sind in der Abb. 8 dargestellt. Die Kurven sind identisch. Wegen der großen Empfindlichkeit der Infrarot-Spektroskopie auf Konstitutionsunterschiede ist die Gleichheit der IR-Spek-

tren neben den oben beschriebenen Befunden der beste Beweis dafür, daß bei der Reaktion von Adenin und D-Ribose mit PPE Adenosin entstanden ist.

Abb. 8:



IR-Spektrum von synthetisiertem Adenosin (unten)

Abb. 8: IR-Spektrum von Vergleichsadenosin ( oben)

Bei der Elution der Säule trat neben dem Adenosin ein zweiter kleinerer Gipfel auf, dessen Elutionspunkt mit dem von

natürlicher Adenylsäure (Adenosinphosphat) zusammenfiel. Die chromatographische Untersuchung in verschiedenen Systemen ergab, daß es sich hierbei um Adenosin-5'-phosphat handelt. Adenosin 2'- und 3'-phosphat haben deutlich verschiedene $R_f$-Werte.

Nachdem die Konstitutionsermittlung abgeschlossen war, wurde die Ausbeute an Adenosin einmal in ihrer Abhängigkeit vom Adenin/Zucker-Verhältnis und einmal von der verwandten PPE-Menge näher untersucht. In der Tabelle 4 sind die Ausbeuten, bezogen auf den Zucker, für verschiedene Adenin/Zucker-Verhältnisse aufgeführt. Die PPE-Menge betrug bei allen Verhältnissen 3 g/200 mg Zucker.

Tabelle 4

| Vorgegebene Adeninmenge in 100 ml + 3 g PPE | Verhältnis Adenin/Ribose | Ausbeute % ca |
|---|---|---|
| 2000 mg | 10 : 1 | 30 - 40 |
| 1000 mg | 5 : 1 | 20 |
| 400 mg | 2 : 1 | 8 |

Abhängigkeit der Adenosinausbeute vom Verhältnis Adenin/Ribose bei 3 g PPE, 200 mg D-Ribose, 37° C und 20 Stunden Reaktionszeit. Lösungsmittel Dimethylformamid.

Wie die Werte in der Tabelle 4 ergeben, läßt sich die Ausbeute an Adenosin durch Vorgabe einer größeren Adeninmenge erheblich steigern. Der nicht-umgesetzte Adeninanteil kann bei der Säulenchromatographie wieder quantitativ und rein zurück-

gewonnen werden.

Die Ausbeuten an Adenosin und Adenylsäure, bezogen auf den Zucker, für verschiedene PPE-Mengen sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

| PPE-Menge | Ausbeute (%) ca | |
|---|---|---|
| | Adenosin | Adenylsäure |
| 1 g | 15 | 3 |
| 3 g | 20 | 6 |
| 10 g | 24 | 16 |

Abhängigkeit der Adenosin- und Adenylsäure-Ausbeute von der PPE-Menge bei 1000 mg Adenin, 200 mg D-Ribose, 37° C und 20 Stunden Reaktionszeit. Lösungsmittel Dimethylformamid.

Die Ausbeute an Adenosin nimmt mit steigender PPE-Menge nur noch wenig zu, da auf Kosten des Nucleosids in steigendem Maße Adenylsäure gebildet wird. Ein Versuch mit Adenosin und PPE in Dimethylformamid ergab, daß das Nucleosid allmählich zu Adenosin-5'-phosphat phosphoryliert wird. Es ist wahrscheinlich, daß die in den Ansätzen gefundene Adenylsäure ein sekundäres Reaktionsprodukt des Adenosins mit dem PPE darstellt. Die Phosphorylierung verläuft langsamer als die N-Glycosidbildung, so daß zunächst hauptsächlich Adenosin gebildet wird. Bei längeren Reaktionszeiten ( über 25 Stunden) oder größeren PPE-Mengen als in der Tabelle angeführt,

wird die Adenosinausbeute zu Gunsten der Adenylsäuresynthese abfallen. Bei den größeren PPE-Mengen wäre es möglich, daß evt. gebildete Polyribose phosphorolytisch in Ribose-1'-(aktiv-phosphat)-5'-(mono-phosphat) gespalten wird, das seinerseits mit Adenin direkt zum Adenosin-5'-phosphat reagiert.

Analog zur Adenosinsynthese wurde Adenin mit 2'-Desoxy-D-ribose, D-Fructose sowie N-Acethylglucosamin umgesetzt. Das N-Glycosid mit 2'-Desoxy-D-Ribose war nach dem Vergleich mit natürlichem 2'-Desoxyadenosin in verschiedenen chromatographischen Systemen und durch Vergleich der Ultraviolett-Absorptionskurven mit diesem identisch. Auch bei den Ansätzen mit D-Fructose und N- Acethylglucosamin konnte chromatographisch oder über Austauschersäulen jeweils neben Adenin eine einheitliche Bande isoliert werden. Diese zeigten eine dem Adenin sehr ähnliche Ultraviolett-Absorptionskurve. Ihr Elutionspunkt bei der Säulentrennung entsprach dem von Nucleosiden. Die Säurehydrolyse ergab dementsprechend wieder Adenin und D-Fructose bzw. N-Acethylglucosamin. Da Vergleichssubstanzen fehlen, kann erst eine eingehende Strukturanalyse Aufschluß über die genaue Verknüpfung der beiden Komponenten ergeben.

Bei den Ansätzen mit 2'-Desoxy-D-Ribose und N-Acethyl-glucosamin lagen die Ausbeuten bei einem Basen/Zucker-Verhältnis von 5 : 1, 20 Stunden Reaktionszeit und 50° C um 20 %, bezogen auf den Zuckeranteil.

Bei der D-Fructose betrug die Ausbeute bei 70° C und einem Verhältnis Base : Zucker von 5 : 1 etwa 10 %.

Der nicht-umgesetzte Basenanteil kann bei der Aufarbeitung leicht wieder zurückgewonnen werden.

Wie die Versuche mit Apurinsäure ergaben, lassen sich auch die Pyrimidine prinzipiell mit einem Zucker nach dem beschriebenen Verfahren verknüpfen. Wegen der geringeren Reaktionsfähigkeit der Pyrimidine ist die Synthese der entsprechenden N-Glycoside mit ungeschützten Zuckern dagegen nur mit kleinerer Ausbeute möglich und wurde daher nicht näher untersucht.

Die Vorteile des beschriebenen Syntheseweges liegen besonders darin, daß es sich um eine einstufige Reaktion handelt, bei der unmittelbar die ungeschützten Zucker eingesetzt werden können. Es können daher auch schwer oder gar nicht zugängliche N-Glycoside dargestellt werden. Hinzu kommt, daß sich in dem verwandten Dimethylformamid eine größere Zahl verschiedener Substanzen lösen als in den bisher notwendigen, meist völlig unpolaren Lösungsmitteln. Bemerkenswert sind die relativ milden Reaktionsbedingungen. Der Angriff des PP-Esters erfolgt zunächst an der acetalischen Oxygruppe. Nur so ist es möglich, in einem Reaktionsschritt mit ungeschützten Zuckern Nucleoside zu synthetisieren. Das Auftreten geringer Mengen von Adenosin-5'-phosphat zeigt, daß, be-

sonders bei größeren PPE-Konzentrationen, auch die alkoholische Oxygruppe phosphoryliert wird. Neben Adenosin-5'-phosphat konnte chromatographisch Adenosin-2:3-cyclisch-phosphat isoliert werden. Die $R_f$-Werte stimmten mit den von A.M. Michelson angegebenen überein (30).

In seiner Eigenschaft, C-ständige OH-Gruppen zu phosphorylieren, stellt der PP-Ester ein Analogon zum Adenosin-triphosphat der Zelle dar.

Totalsynthese von Nucleinsäuren

Die Versuche zeigen also, daß der PP-Ester ein vorzügliches Mittel ist, um C-ständige Oxygruppen zu phosphorylieren. Es wurde nun geprüft, ob durch PPE auch eine Aktivierung der Phosphatgruppe möglich ist. Die Polykondensation derart aktivierter Nucleotide zum Beispiel wäre ein Weg zur Totalsynthese von Nucleinsäuren.

Die Darstellung von Polynucleotiden und damit von Nucleinsäureanalogen ist von erheblichem Interesse. So dienen Polynucleotide als Modell substanzen für bio-chemische und physiko-chemische Untersuchungen zu Fragen der Vermehrung und der Entstehung selbstvermehrungsfähiger Systeme. Auch von der chemotherapeutischen Seite her dürften synthetische Nucleinsäuren in Zukunft von Interesse sein.

Mehrere Arbeitsgruppen versuchten die chemische Synthese von Polynucleotiden. Jedoch gelang es in keinem Fall, einen Polymerisationsgrad von mehr als 13 zu erzielen.

Todd und Michelson war es im Jahre 1955 gelungen (31), ein Dinucleotid zu synthetisieren. Hierzu wurde 3'-O-Acethylthymidin mit Thymidin-3'-(benzyl-phosphorochlorid)-5'-(dibenzylphosphat) kondensiert und das Dinucleotid durch anschließende Hydrogenolyse der Benzylgruppen gewonnen.

Khorana, Pol, Markham und Tener konnten 1958 Oligonucleotide darstellen (32), indem sie Dicyclohexyl-carbodiimid mit Thymidylsäure kondensierten. Als unerwünschte Nebenprodukte entstanden stets auch cyclische Oligonucleotide. Die maximale Kettenlänge betrug 11 Nucleotideinheiten, die mittlere nur 3 - 4. Die Ausbeuten lagen um 5 %.

Michelson (30) stellte zunächst mittels Tetraphenyl-pyrophosphat oder Diphenyl-phosphorchlorid in wasserfreiem Dioxan unter Zusatz von Tri-n-butylamin aus den Nucleotiden die cyclischen Phosphate her, die dann ihrerseits mit weiterem Kondensationsmittel polymerisiert wurden. Das Nucleotid muß hierbei als Tri-n-octylammonium- oder Tri-n-decylammonium-Salz eingesetzt werden. Die maximale Kettenlänge beträgt 13, die mittlere 6.

Cramer stellte ein Oligonucleotid aus Adenylsäure dar (33). Zunächst wird aus dem Enolphosphat des Malonesters mit Adenosin-5'-phosphat in absolutem Dimethylformamid und Tri-n-butylamin unter Zugabe einer acetonischen NaJ-Lösung das $P^1$-(adenosyl-5'-)-$P^2$-diäthyl-pyrophosphorsaure-Na Salz dargestellt. Hierzu muß die Adenylsäure vorher im Hochvakuum über $P_2O_5$ getrocknet werden. Durch Selbstkondensation entsteht aus der beschriebenen Verbindung eine Oligoadenylsäure. Es liegen bis jetzt nur Angaben über eine so dargestellte Oligothymidylsäure vor; maximale Kettenlänge 5, Ausbeute 3 %.

Die ersten Versuche zur Polykondensation von Nucleotiden zu Nucleinsäuren wurden mit Adenylsäure durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden zunächst in Anlehnung an die N-Glycosidsynthese in Dimethylformamid durchgeführt. Nach 20 Stunden bei 60° C blieb nach einer anschließenden 2tägigen Dialyse gegen Wasser nur sehr wenig undialysables Material zurück. Es war also keine Polykondensation eingetreten. Hiernach wurde auf ein Lösungsmittel ganz verzichtet und die Adenylsäure direkt mit dem viskösen PPE im Überschuß versetzt. Durch die erhöhte Konzentration des Nucleotides wird ein vorzeitiger Kettenabbruch durch die Bildung von cyclischen Oligonucleotiden weitgehend vermieden. Nach 20 Stunden und 60° C konnte dieses Mal nach einer 2tägigen Dialyse eine größere Menge an nicht-dialysablen Produkten isoliert werden. Die Ausbeute wurde aus der Extinktion im UV bestimmt und betrug 15 %. Die Ausbeutebestimmung aus der Auswaage des Dialyserückstandes ergab 20 %. Das Produkt enthält daher neben einer Polyadenylsäure noch etwas Salz.
Bei der Zugabe von wenig Pyridin erhöhte sich die aus der Extinktion ermittelte Ausbeute auf 21 %.
Es war also tatsächlich auf diesem Wege gelungen, die Adenylsäure zu polykondensieren.

Es war nun der Polymerisationsgrad und die Verknüpfungsart der synthetisierten Polyadenylsäure näher zu untersuchen. Aus der in der Ultrazentrifuge ermittelten Sedimentationskon-

stanten und der im Ostwaldviskosimeter bestimmten Viskositätszahl (34) ergab sich ein mittleres Molekulargewicht von 20 000: die maximale Kettenlänge dürfte erheblich höher liegen.

Ein besonders schöner Beweis für die hochmolekulare Struktur der Polyadenylsäure ist die in der Abb. 9 wiedergegebene elektronen-mikroskopische Aufnahme. Die Fäden entsprechen in ihrem Aussehen ganz denen von natürlicher hochmolekularer Nucleinsäure. Aus der Länge der abgebildeten Fäden ergibt sich, daß viele Hunderte Adenylsäuren hier aneinandergereit sind. Die Aufnahme ist die erste von chemisch-synthetisierten Polynucleotiden.

Abb. 9: Elektronen-mikroskopische Aufnahme von Polyadenylsäure (chemisch synthetisiert). Bedampft mit Pt/Rh. 60 000 x

Für die hochmolekulare Struktur des Kondensationsproduktes spricht ferner die Hyperchromie. Bei der Alkalispaltung der synthetisierten Polyadenylsäure erhöht sich die UV-Extinktion um 40 - 50 % (s. Abb. 10).

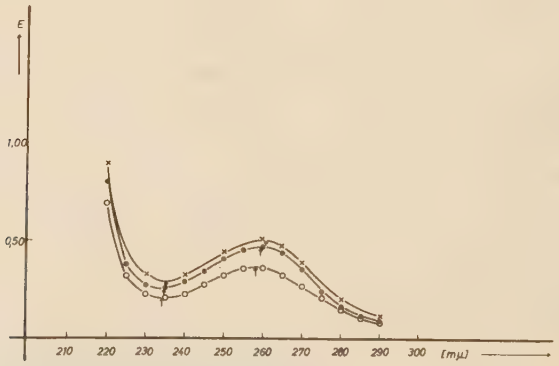



Abb. 10: UV-Extinktionskurven von Polyadenylsäure bei fortschreitender Alkalispaltung.
0,2 n NaOH; 37° C; Bei den Alkalispaltungen bedeutet: •–• Stdn. 37°C; x-x Stdn. Zimmertemp. (je 24Stdn.)

Dieses Verhalten ist charakteristisch für die Polynucleotide und Nucleinsäuren. Durch das Alkali wird die Polynucleotidkette zu den Nucleotiden hydrolysiert. Hierbei geht die Beeinflussung der $\pi$-Elektronen der Basen untereinander verloren, was eine Extinktionserhöhung zur Folge hat.

Als nächstes mußte untersucht werden, wie die Adenylsäuren in dem Polymeren untereinander verknüpft sind.

Die Einwirkung des Enzyms-Pankreas-Ribonuclease auf die Polyadenylsäure ergab keinen Abbau. Dieser Befund stimmt mit der Erfahrung überein, daß dieses Enzym nur hinter einem Pyrimidin-Nucleosid spaltet.

Dagegen wurde die Polyadenylsäure von dem Enzym Schlangengift-Diesterase angegriffen. Die Viskositätszahl sank hierbei von 25 auf 8. Es müßten demnach zu einem größeren Teil natürliche 3'-5'-Verknüpfungen vorliegen. Nur diese werden von Enzymen gespalten.

Eine genauere Ermittlung der Menge an natürlichen 3'-5'-Bindungen war mit dem uns freundlicherweise von Dr.A.M. Michelson zur Verfügung gestellten Enzym $T_2$ nach Prof. Egami möglich. Dieses Enzym spaltet spezifisch 3'-5'-Bindungen hinter Adenosin. Die Spaltung wurde bei pH 4,5 und 37° C durchgeführt. Die Hydrolyse des Polynucleotides wurde durch potentiometrische Titration von Zeitproben verfolgt. Abb. 11 zeigt den zeitlichen Verlauf der Spaltung. Es wurde hierzu der Gesamtverbrauch an n/100-NaOH zwischen pH 4,0 und 8,0 jeweils bestimmt.

In der Abb. 12 ist die vollständige Titrationskurve des Spaltungs-Endwertes nach 24 Stunden dargestellt. Dieser beträgt bei dem vorliegenden Präparat ca. 65 - 70 %. Überraschend war, daß auch eine als Vergleichssubstanz untersuchte Polyuridylsäure durch das $T_2$-Enzym zu einem großen

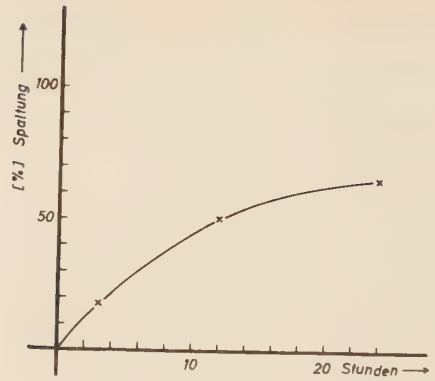



Abb. 11: Enzymatische Spaltung von Polyadenylsäure mit $T_2$-Enzym bei pH 4,5; 37° C und 0,01 m EDTA

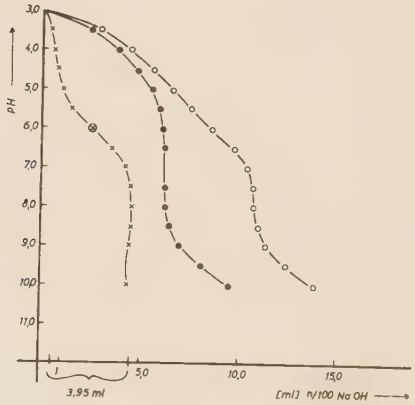



Abb. 12: Titrationskurve des Hydrolyseendwertes von Polyadenylsäure mit $T_2$-Enzym

o-o Titrationskurve; •-• Nucleosidkurve; x-x Phosphatkurve

Teil gespalten wurde. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß das verwandte Enzympräparat ein Rohprodukt darstellte und daher noch Spuren RNase enthalten konnte (Ribonuclease spaltet spezifisch eine 3'-5'-Bindung hinter einem Pyrimidin-Nucleotid).

Das synthetisierte Polykondensationsprodukt ist nach den beschriebenen Untersuchungen eine Polyadenylsäure mit einem Polymerisationsgrad von mindestens 60 und etwa 70 % an natürlichen 3'-5'-Bindungen. Da bei den Reaktionen die käufliche Adenylsäure, die aus einem Gemisch von Adenosin-3'- und Adenosin-2'-Phosphat besteht, verwandt wurde, ist der Wert von 70 % an 3'-5'-Bindungen sehr gut. Bei einem reinen Adenosin-3'-phosphat als Ausgangsmaterial dürfte eine fast 100 %ige natürliche 3'-5'-Verknüpfung in der Polyadenylsäure vorliegen.

Außer Adenylsäure wurden die Ribonucleotide Guanylsäure, Cytidylsäure und Uridylsäure kondensiert. Es wurden die käuflichen Nucleotide (California Corporation) verwandt. Die Ausbeuten und Molekulargewichte von Poly-Guanylsäure und Poly-Cytidylsäure waren etwa denen von Poly-Adenylsäure gleich. Bei der Poly-Uridylsäure betrug das mittlere Molekulargewicht 50 000 und die Ausbeute ca. 25 %. Auch Mischpolymerisate wurden mit PPE synthetisiert. Die gefundenen Daten zur Charakterisierung der Polynucleotide und die Ausbeuten sind in der Tabelle 6 zusammengestellt. In der Tabelle

Tabelle 6

| Poly- | $S_{20}$ Cg→o | $D_{20}$ | $(S_{20};\eta)_M$ | $[\eta]_v$ | % $P_{gef.}$ | % $P_{theor.}$ | alkal.Hyperchromie 0,2 n NaOH [%] 24h 37°C +24h Z.t. | 24h 37°C + 24h Z.t. A.Michels. | RNase | Schlangengift-Diesterase | % Ausbeute bis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 2,5 | 10 | 20600 | 22 | 13,8 | 9,4 | 37 | 37 | - | + | 20 |
| C | 2,0 | 12 | 14600 | 23 | 12,1 | 10,1 | 16 | 16 | (+) | + | 20 |
| G | 2,9 | 11 | 27500 | 27 | 10,3 | 9,0 | bis 28 | 0 | - | (+) | 20 |
| U | 4,0 | 9 | 50000 | 32 | 12,0 | 10,1 | bis 20 | 8,6 | + | + | 25 |
| T | 2,3 | 11 | 18200 | 24 | 10,3 | 10,2 | bis 47 | - | | + | 45 |
| AU(1:1) | 2,4 | 12 | 21100 | 29 | 13,5 | - | 10 | 9 | + | + | 10 |
| AC(4:1) | 1,9 | 16 | 13600 | 22 | 12,9 | - | 11 | - | (+) | + | 20 |
| GC(1:1) | 2,1 | 12 | 17100 | 29 | 13,9 | - | 16 | - | (+) | + | 9 |
| ACGU (1:1:1:1) | 1,8 | 17 | 9500 | 30 | 13,1 | - | 7 | 14 | + | + | 6 |

Abkürzungen: A = Adenosin-2'(3')-phosphorsäure; C = Cytidin-2'(3')-phosphorsäure;
G = Guanosin-2'(3')-phosphorsäure; U = Uridin-2'(3')-phosphorsäure;
T = (2'-desoxy)Thymidin-5'-phosphorsäure; RNase = Ribonuclease;
A.Michels.: Vergleichswerte von (30); Z.t.: Zimmertemperatur;

sind die Enzymabbaureaktionen mit + bezeichnet, bei denen nach 30stündiger Inkubation bei 37° C ca. 50 % des Polynucleotides im Chromatogramm als Mono- oder Dinucleotid wandern. Bei geringerem Anteil wurde das Zeichen (+) verwandt. Eine vollständige Spaltung trat in keinem Fall ein.

Im Gegensatz zu den Polypurinnucleotiden wurden die Polypyrimidinnucleotide von Pankreas-RNase gespalten. Der enzymatische Abbau wurde chromatographisch und viskosimetrisch bestimmt. Die weitgehende, wenn auch nicht vollständige Spaltung zum Beispiel bei der Polyuridylsäure, spricht für eine überwiegend natürliche 3'-5'-Verknüpfung innerhalb der Kette. Wie weit daneben noch 2'-5'-Bindungen vorkommen, muß noch geprüft werden. Durch Schlangengift-Diesterase wurden die Polynucleotide alle hydrolysiert. Die Hyperchromie-Werte lagen stets unter denen der Polyadenylsäure. In den Abb. 13; 14 und 15 sind die Ultraviolett-Absorptionskurven und ihre Erhöhung bei der Alkalispaltung dargestellt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten auch hier deutlich die Fadenstruktur.

Ein empfindlicher Nachweis für das Vorliegen einer längeren Polynucleotidkette ist die Extinktionserniedrigung beim Vermischen von Polynucleotiden, die sich ihrer Struktur nach unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken aneinanderlagern können. Nach den Untersuchungen von G. Felsenfeld, D.R. Davies und A. Rich (35) wird ein derartiger Komplex (Helix)

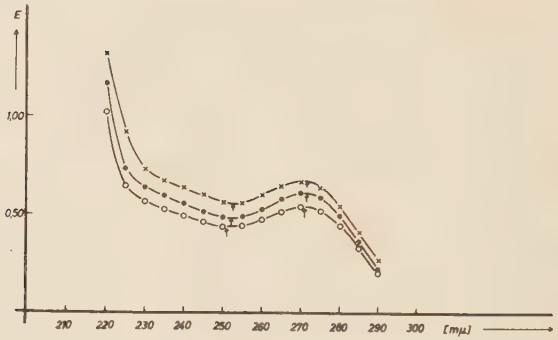



Abb. 13: UV-Extinktionskurven von Polycytidylsäure bei fortschreitender Alkalispaltung. 0,2 n NaOH; 37° C;

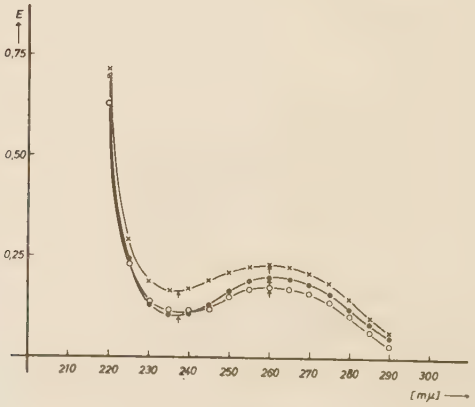



Abb. 14: UV-Extinktionskurven von Polyguanylsäure bei fortschreitender Alkalispaltung. 0,2 n NaOH; 37° C;

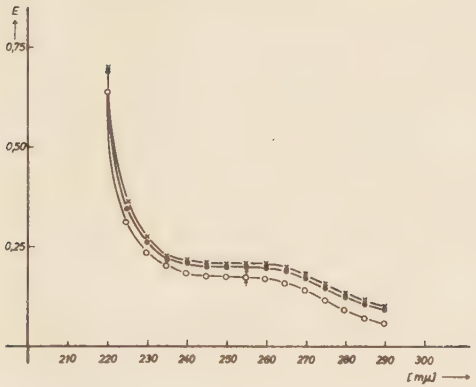



Abb. 15: UV-Extinktionskurven von Polyuridylsäure bei fortschreitender Alkalispaltung. 0,2 n NaOH; 37° C;

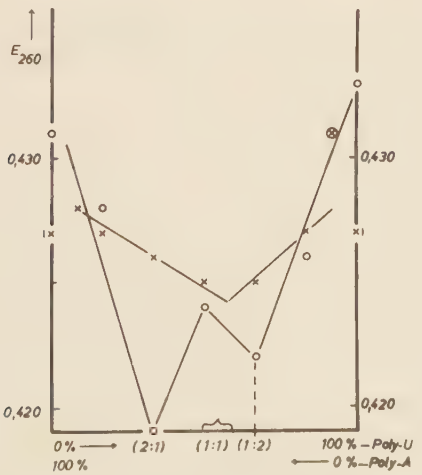



Abb. 16: Helix-Bildung zwischen Polyadenylsäure und Polyuridylsäure; x ohne $Mg^{++}$; o mit $3{,}3 \times 10^{-2}$ Mol $Mg^{++}$; (chemisch synthetisiert).

(36) zum Beispiel zwischen einer Polyadenyl- und Polyuridylsäure gebildet. Abb. 16 zeigt die schwache aber deutliche Extinktionserniedrigung bei der Mischung einer chemisch-synthetisierten Polyadenyl- und Polyuridyl-säure. Das Extinktionsminimum bei einem Molverhältnis Polyadenylsäure zur Polyuridylsäure (von 1 : 1) spricht für die Bildung eines 1 : 1-Komplexes. Bei der Zugabe von $3{,}3 \times 10^{-2}$ Mol $Mg^{++}$ besitzt die Extinktionskurve zwei Minima. Die Bildung eines 2 : 1 und 1 : 2-Komplexes ist hiernach wahrscheinlich. Auch dieser Effekt war bisher bei chemisch synthetisierten Polynucleotiden nicht zu beobachten gewesen, da die bis jetzt erzielten Kettenlängen zu gering waren.

Es gelang, nicht nur die Ribo-Nudeotide zu polymeren Analogen der RNS, sondern auch die empfindlicheren 2'-Desoxyribo-Nucleotide zu polymeren Analogen der DNS zu kondensieren. So wurde zum Beispiel 2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphat zu Polythymidylsäure kondensiert. Im Gegensatz zu den Ribonucleotiden wurde hier nur 6 Stunden bei $50^{\circ}$ C kondensiert. Die Ausbeuten lagen bei den verschiedenen Ansätzen zwischen 30 und 45 %. Das mittlere aus der Sedimentationskonstanten und der Viskositätszahl ermittelte Molekulargewicht betrug 18 000. Da bei den Desoxynucleotiden die $C_2'$-Oxygruppe fehlt, dürften vorwiegend natürliche 3'-5'-Bindungen vorliegen. Die aus der Änderung der in Abb. 17 dargestellten UV-Absorptionskurven ermittelte Hyperchromie betrug 48 %. Weitere Daten zur Cha-

rakterisierung des Produktes sind in der Tabelle 6 angeführt.

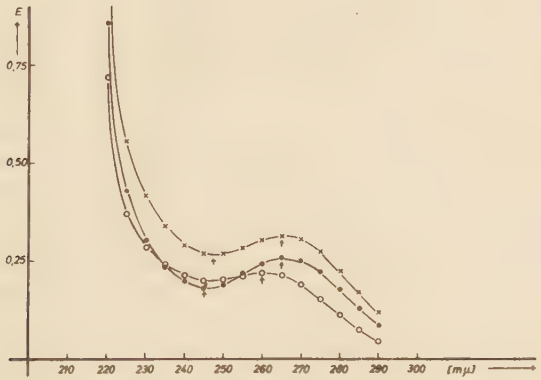



Abb. 17: UV-Extinktionskurven von Polythymidylsäure bei fortschreitender Alkalispaltung. 0,2 n NaOH; 37° C;

Die Ansätze mit wenig Pyridin ergaben allgemein eine höhere Ausbeute als die ohne Pyridin, dagegen waren die Hyperchromiewerte der mit Pyridin dargestellten Polynucleotide stets geringer. Gewisse Schwierigkeiten bereitet manchmal die Entfernung von überschüssigem Phosphat aus den Ansätzen. Bei der beschriebenen Aufarbeitungsmethode entstehen durch die Zersetzung des PP-Esters mit Wasser zum Teil geringe Mengen an Polyphosphaten, deren nachträgliche Entfernung schwierig ist. Es wurde daher ein Reaktionsansatz zunächst gegen Dimethylformamid dialysiert. Hierbei wird der nicht-umgesetzte

PP-Ester unzersetzt entfernt. Wie die ersten Versuche hierzu ergaben, ist die Aufarbeitungsmethode wahrscheinlich besser. Auch eine direkte Fällung der Polynucleotide aus der Dimethylformamidlösung mit Äthanol/Äther ist möglich. Hierbei werden allerdings auch die Oligonucleotide mit ausgefällt.

Daß bei den vorliegenden Kondensationen mit PPE der durchschnittliche Polymerisationsgrad zwischen 30 und 150 liegt, dürfte zu einem großen Teil auf einer guten Löslichkeit des Esters für Polynucleotide im Gegensatz zu den bisher verwandten Lösungsmitteln beruhen. Hervorzuheben ist, daß bei der Polykondensation mit PPE geringe Mengen an Wasser nicht stören. Das Nucleotid muß also nicht - wie bisher - besonders getrocknet werden.

Die enzymatischen Abbauversuche, die elektronen-mikroskopischen Aufnahmen und die Bildung von Komplexen aus den Polynucleotiden zeigen, daß die synthetisierten Substanzen den natürlichen zumindestens sehr ähnlich sind. Eine chemische Synthese von Nucleinsäuren war bisher nicht gelungen.

## III. Experimenteller Teil

### 1.) Gewinnung der RNS aus Bäckerhefe

Die RNS aus Bäckerhefe wurde in weitgehender Anlehnung an die Vorschrift von Chestfield, Smith und Allan (37) isoliert. In einem 3 Liter Becherglas wurden 10 g kristallisiertes Natriumdodecylsulfat, 25 ml Äthanol, 2,23 g $NaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$ und 1,70 g $KH_2PO_4$ in 500 ml Wasser gelöst. Unter Rühren und Kochen wurden nun 150 g Hefe in sehr kleinen Anteilen zugegeben; die Temperatur sank dabei auf ca. 87-90° C. Der Inhalt wurde sodann in ein Becherglas gegossen, das mit einer Kohlensäure-Methanol-Mischung gekühlt wurde. Beim Rühren sank dabei die Temperatur der Lösung rasch auf ca. 4° C. Darauf wurde 30 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in das doppelte Volumen kalten Äthanols (0° C) eingerührt. Der weiße Niederschlag wurde wiederum bei 2500 U/min in der Kälte gesammelt und 2mal mit je 150 ml kalten 67 %igen Äthanol gewaschen. Dem Waschalkohol waren ca. 10 Tropfen 2 m NaCl-Lösung zugesetzt worden. Die Roh-RNS wurde jeweis durch Zentrifugieren gesammelt und in 80 %igem Äthanol suspendiert, darauf über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde durch Zentrifugieren bei 3000 U/min der Niederschlag wiederum gesammelt und in 140 ml Wasser gelöst. Die Lösung hatte ein pH von 8,0 und wurde mit 1-n Essigsäure neutralisiert. Darauf wurde bei 0° C 30 min

in der Spinco-Ultrazentrifuge bei 20 000 U/min zentrifugiert. Die Ausbeute betrug nach mehrmaligen Umfällen bei den verschiedenen Präparationen 500 - 800 mg an reiner RNS.

2.) Darstellung von DNS aus Kalbs-Thymusdrüsen

Die Isolation der Thymus-DNS erfolgte nach S.Zamenhof (38). Es wurden ca. 40 g im Schlachthaus sofort eingefrorene Thymusdrüsen aufgetaut, vom Fett und Bindegewebe befreit und in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden 5mal mit je 100 ml eiskaltem 0,1 molaren Natriumcitrat-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Darauf wurde das Gewebe in einem Starmix bei $4^{\circ}$ C unter Zugabe von 250 ml eiskaltem 0,1 molaren Natriumcitratpuffer homogenisiert. Die Mischung wurde darauf 30 min gekühlt, bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde wiederum in 250 ml 0,1 m Natriumcitrat-Puffer aufgenommen und wie oben zentrifugiert. Zum Schluß erfolgte Extraktion des Rückstandes mit 1 Liter 2-m-NaCl-Lösung im Starmix. Nachdem die Mischung einen Tag bei $4^{\circ}$ C gestanden hatte, wurde bei 3000 U/min wiederum zentrifugiert. Die DNS wurde aus dem Überstand mit dem zweifachen Volumen kalten Äthanol (150 ml pro Stunde) unter Rühren ausgefällt. Die Roh-DNS wurde darauf in 1 Liter einer 0,14 molaren NaCl-Lösung eingerührt, welche 0,015 molar an Natriumcitrat war (pH 7,1) und pro 1000 ml 5 g kristallisiertes

Natriumdodecylsulfat gelöst in 45 ml Äthanol und 50 ml Wasser- enthielt. Nun wurde eine konzentrierte NaCl-Lösung zugegeben, bis die Lösung 5 %ig an NaCl war. Nach einstündigem Rühren bei Zimmertemperatur und Stehenlassen bei 4° C über Nacht wurde das ausgefällte Natriumdodecylsulfat und evtl. kleine Mengen RNS in der Spinco-Ultrazentrifuge bei 20 000 U/min = 59000 g und 0° C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde daraufhin nochmals mit dem zweifachen Volumen kalten Äthanols gefällt, in 1 Liter der oben beschriebenen 0,14 m NaCl-Lösung gelöst und mit NaCl wieder ausgefällt. Das ausgefallene Natriumdodecylsulfat wurde wiederum in der Spinco-Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Nach abermaliger Ätbanolfällung wurde die reine DNS in einer 0,14 molaren NaCl-Lösung, die 0,15 molar an Natriumcitrat war (pH 7,1), zu einer klaren, hochviskosen Lösung aufgenommen. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 900 - 1050 mg.

3.) Reinheitsprüfungen der Nucleinsäuren

DNS-Gehalt: Die Bestimmung des DNS-Gehaltes in den RNS-Präparationen erfolgte nach Dische mittels Diphenylamin (39). Zur Untersuchung wurden bei der Hefe-RNS 5,1 mg pro ml eingesetzt. Die DNS-Standardlösung zum Vergleich enthielt 97 µg/ml.

Proteingehalt: Der Proteingehalt der Nucleinsäure-Präparate

wurde nach der verfeinerten Biuret-Reaktion von R.Markham und J.D.Smith (40) bestimmt. Ein ml der Nucleinsäure-Lösung mit einem Gehalt von ca. 5 mg wird mit einem Tropfen einer 0,5 %igen $CuSO_4$-Lösung versetzt, mit festem KOH übersättigt und mit etwa einem halben ml Äthanol ausgeschüttelt. Der mit der übersättigten wässrigen Phase nicht mischbare Alkohol blieb dabei farblos. Blindversuche ergaben, daß noch ca. 45 µg Protein mit dieser Methode nachweisbar sind. Hieraus ergibt sich ein Proteingehalt von jeweils weniger als 1 %. Die N- und P-Bestimmungen erfolgten in der üblichen Weise nach Kjeldahl und Fiske-Subarow.

Viskositätsmessungen: Die Viskositätsmessungen wurden im Ostwald-Kapillarviskosimeter bei 20,0 $\pm$ 0,1° C und einem Flüssigkeitsvolumen von 2,8 ml durchgeführt. Es wurden Verdünnungsreihen durchgeführt, um daraus die Viskositätszahl $[\eta]_v$ (intrinsic viscosity) extrapolieren zu können. Die Eigenschaften der Präparate sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Molekulargewichte wurden aus der Viskositätskonstante und Sedimentationskonstante nach einer von A.Gierer für die RNS abgeleiteten Formel berechnet (34).

Tabelle 7

| | Hefe-RNS | Thymus-DNS |
|---|---|---|
| DNS-Gehalt | 0,5 % | - |
| Proteingehalt | 1 % | 1 % |
| Phosphor | 8,2 % | 9,8 % |
| Stickstoff | 13,4 % | 18,6 % |
| Atomar.N/P | 3,6 | 4,1 |
| Viskosität $[\eta]_v$ 0,02 m Phosphat pH 7,0 | 65 | ca $10^3$ |
| Sedimentationskonstante $S_{20}$ 0,02 m Phosphat pH 7,0 | 4,5-5,0 | - |
| Molekulargewicht aus $[\eta]_v$ und $S_{20}$ | 65000 | $6 \times 10^6$ |

4.) Bestimmung der Sedimentationskonstanten und der Diffusionskonstanten

Die Sedimentationskonstante $s_{20}$ wurde in der Phywe-Ultrazentrifuge bei 49 500 U/min entsprechend ca. 150 000 g bei 8° C gemessen. Aus dem Sedimentationsdiagramm ergab sich dabei für die Hefe-RNS ein Wert von $s_{20}$ = 5 S. Eine Verdünnungsreihe wurde in diesem Falle nicht durchgeführt, da die eingesetzte Lösung nur 0,08 %ig war. Die Messung erfolgte in 0,02 m Phosphatpuffer, pH 7,4 und einer Konzentration von 0,82 mg/ml.

Die Diffusionskonstante wurde in einer Schieberzelle (Zusatzgerät zur Phywe-Ultrazentrifuge) bei 20° C gemessen. Bei den vorliegenden Polyelektrolyten tritt allerdings die Diffusionskonstante D als Bestimmungsgröße für das Molekulargewicht gegenüber der Viskositätszahl $[\eta]_v$ zurück.

5.) Die potentiometrische Titration

Die Titrationen wurden mit dem Autotitrator der Firma Radiometer, Kopenhagen, pH-Genauigkeit 0,02 Einheiten, durchgeführt. Titriert wurde bei 20,0° C unter magnetischem Rühren und Stickstoff mit n/100 - NaOH aus einer Feinbürette mit einer Ablesegenauigkeit von 0,02 ml. Die Eichung erfolgte jeweils mit Standard-Acetatpuffer von pH 4,62. Für die vollständige Titrationskurve wurde der Verbrauch an n/100-NaOH in pH-Intervallen von 0,5 pH Einheiten gemessen.
Bei den Spaltungsversuchen wurde eine Lösung von 65 mg Nucleinsäure in 30 ml Wasser auf einen pH-Wert von 2,00 eingestellt und im Schlifferlenmeyer auf 37° C gehalten. Ein Abbau durch Mikroorganismen wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen Chloroform verhindert. Zu Beginn der Hydrolyse, nach 23, 70, 100 und 225 Stunden wurden jeweils 6 ml entsprechend 13 mg Nucleinsäure entnommen, mit 2n-NaOH auf pH 3,9 und mit n/100-NaOH auf pH 4,00 eingestellt. Der Verbrauch an n/100-NaOH zwischen pH 4,00 und 8,05 gibt direkt den Spaltungsgrad der Nucleinsäurekette an.

6.) Messung der Purinabspaltung

Die bei der potentiometrischen Titration (5.) entnommenen Zeitproben wurden nach der Titration gefriergetrocknet, in 1 ml Wasser aufgenommen und für zwei Parallelbestimmungen je 0,2 ml auf Whatman Nr. 1-Papier aufgetragen. Das freigesetzte Adenin und Guanin wurde darauf chromatographisch bestimmt. Am geeignetsten erwies sich das System n-Butanol/Äthylenglycol/Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 1. Die hochmolekularen Nucleinsäuren und die Oligonucleotide wandern in diesem System nicht. Der $R_f$-Wert für Adenin betrug 0,52, für Guanin 0,23 $\pm$ 0,02 Einheiten. Die im UV-Licht gut sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und mit n/10-HCl 45 min bei 45° C eluiert. Die Konzentration wurde bei pH 2,0 aus der Extinktion bei 260 mμ bestimmt. Hierbei wurden folgende Extinktionswerte zugrundegelegt: Adenin 1 mMol/l = 13,0, bei Guanin = 8,0.

7.) Darstellung des Polyphosphorsäure-äthylesters

In Anlehnung an die Vorschrift von K.Langheld (41) wurden 150 g analysenreines $P_2O_5$ in einer Mischung aus 150 ml $CHCl_3$ und 300 ml absoluten Äther am Rückfluß gekocht. Nach etwa 15 Stunden hatte sich das Pentoxyd zu einer klaren Lösung gelöst. Hiernach wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abdestilliert und der farblose, zähflüssige Ester im Kühlschrank aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 100 %.

8.) Darstellung von Apurinsäure

Den gefundenen Hydrolysekonstanten für DNS entsprechend wurde zu einer Lösung von 25 mg Thymus-DNS in 50 ml Wasser unter Rühren langsam 1n HCl hinzugegeben bis der pH-Wert 2,40 betrug und 48 Stunden bei 37° C im Schlifferlenmeyer stehengelassen. Abbaureaktionen durch Mikroorganismen wurden durch Zugabe von wenigen Tropfen Chloroform verhindert. Die Lösungen zeigten manchmal eine schwache Opaleszenz, jedoch trat niemals eine Fällung auf. Zum Schluß wurde der Reaktionsansatz ca. einen Tag gegen Wasser dialysiert. Die Gefriertrocknung ergab ein weißes krümeliges Produkt. Da sich die hochmolekulare Substanz nur sehr langsam, besonders in Dimethylformamid, löst, wurde das Innendialysat gegen steigende Konzentrationen von Dimethylformamid in Wasser dialysiert. Es gelang auf diesem Wege, eine klare und konzentrierte Lösung von Apurinsäure in Dimethylformamid darzustellen. Infolge der Purinabspaltung betrug das atomare N/P-Verhältnis statt 4,1 - bei der Thymus-DNS - 2,2.

Für die jodometrische Bestimmung der freien Aldehydgruppen wurden 2 ml einer 0,1 %igen Lösung von Apurinsäure in einem 50 ml Schlifferlenmeyer mit 3 ml einer 0,02n-Jodlösung, versetzt, mit Wasser auf 6 ml aufgefüllt und 0,2 ml einer 5 %igen Sodalösung hinzugefügt. Darauf wurde der Kolben sofort verschlossen und 30 min auf 21° C gehalten. Anschliessend wurde die Lösung mit 0,5 ml 1n-$H_2SO_4$ angesäuert und mit

0,02n-Thiosulfatlösung titriert. Der Verbrauch an Thiosulfatlösung ergab, daß 47 % der Desoxyribose in der Apurinsäure freie Aldehydgruppen aufweisen.

9.) Einbau von $C^{14}$-markierten Basen in Apurinsäure

Es wurden 8 µC $C^{14}$-Adenin mit 160 mg unmarkiertem Adenin in 20 ml Dimethylformamid mit wenigen Tropfen konz. HCl gelöst und hierzu 10 mg Apurinsäure, gelöst in 30 ml Dimethylformamid, zugegeben. Die Lösung wurde darauf mit 0,2 - 0,3 g PPE versetzt und 24 Stunden auf 37° C gehalten. Der Ansatz wurde anschließend 2 Tage gegen 9mal 2 Liter Wasser dialysiert. Hiernach waren das überschüssige Adenin, das Dimethylformamid und die durch Zersetzung des Esters entstandenen Phosphate herausdialysiert. Dem Dialysewasser wurden jeweils einige Tropfen Chloroform zugegeben. Das Innendialysat wurde nun gefriergetrocknet, der Rückstand in 2 ml Wasser gelöst und 0,5 ml davon auf einem Al-Schälchen mit einer IR-Lampe eingedampft. Die Schälchen wurden in der Meßgruppe der Firma Frieseke u. Hoepfner mit Probenwechsler im Methandurchflußzähler ausgemessen

Der Kontrollversuch, welcher zeigen sollte, ob an evt. undialysablen Hydrolyseprodukten des PP-Esters markiertes Adenin adsorbiert wurde ergab einen Aktivitätswert von 25 - 30 Imp/min, lag also in der Größenordnung des allgemeinen Strahlungsnullwertes. Der Versuch wurde mit 4 µC $C^{14}$-Adenin, 80 mg un-

markiertem Adenin und 0,2 g PPE in 25 ml Dimehtylformamid durchgeführt. Die Dialysedauer gegen Wasser betrug 2-3 Tage.

Die jeweiligen Bestimmungen des Nullwertes mit $H_3PO_4$ statt PPE erfolgten unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den Ansätzen mit PPE. Die Phosphorsäuremenge betrug 0,2 g.

Unter den gleichen Bedingungen wie beim Adenin erfolgte ein Einbau von $C^{14}$-markiertem Guanin, Uracil und Thymin.

10.) Enzymatische Abbaureaktionen der synthetisierten Nucleinsäuren

Der DNase-Abbau der aus Apurinsäure resynthetisierten DNS erfolgte mit einem einmal umkristallisierten Präparat der Worthington Biochemical Corporation, Freehold/N.J. Der Ansatz enthielt in 60 ml Wasser 10 mg resynthetisierte DNS, 83 µg DNase und war 0,02 molar an $MgSO_4$. Die Temperatur betrug 37° C der pH-Wert wurde mit n/10-NaOH im Autotitrator auf 7,0 gehalten. Nach etwa 2 Stunden war die Viskositätszahl von ca. $10^3$ auf 35 gefallen.

Der weitere Abbau mit Schlangengift-Diesterase erfolgte mit dem Präparat Crotalus Adamanteus, Silver Springs, Ross Allen. Der pH-Wert betrug 9,0, die Temperatur 37° C. Die Lösung war 0,06 %ig an DNS-Hydrolysat und 0,01 molar an $MgCl_2$.

Die Spaltung der Polyadenylsäure mit $T_2$-Enzym. Der Abbau erfolgte mit einem freundlicherweise von Dr.A.M.Michelson zur

Verfügung gestellten Präparat. 90 mg synthetisierter Polyadenylsäure [x] wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit EDTA auf 0,01 molar eingestellt. Die Reaktionslösung wurde im Autotitrator mit n/10-NaOH auf pH 4,5 bei 37° C gehalten. Nach 3, 12 und 24 Stunden wurden jeweils 22,2 ml entnommen und bei 20° C mit n/100-NaOH von pH 4,00 bis pH $8,0_5$ titriert. ([x] und ca. 1 mg $T_2$-Enzym)

11.) Enzymatische Einwirkung von Pankreas-RNase auf Hefe-RNS

Zur Untersuchung des RNase-Abbaues der Hefe-RNS wurde eine 5-fach umkristallisierte Pankreas-RNase der Firma Pentex Incorporation, Illinois, verwand. Es wurden hiervon auf der Mikrowaage 74 γ des Enzyms abgewogen und in 1 ml Wasser gelöst. Die Enzymlösung wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Der Hydrolyseansatz enthielt in 100 ml Wasser 25,5 mg Hefe-RNS und 25 γ RNase gelöst. Die Lösung wurde im Thermostaten auf 37,0 ± 0,1° C und mittels n/10 NaOH im Autotitrator auf pH 6,5 gehalten. Zur Messung wurden jeweils 20 ml entnommen und im Autotitrator vom pH 5,00 - 8,05 titriert. Der Kurvenverlauf der Abb. 4 zeigt deutlich den zeitlichen Anstieg an sekundären Phosphatgruppen; als Endwert ergibt sich eine 40 %ige Spaltung.
Abbau der DNS mit DNase s. 10.).

12.) Darstellung von Adenosin

9-N-(1'-ribosyl-)-Adenin

a) 1000 mg Adenin (California-Corporation A-Grad) wurden mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml Dimethylformamid gelöst, etwa 3 g PPE hinzugegeben und im Laufe von 6 - 10 Stunden 200 mg D-Ribose - gelöst in 50 ml Dimethylformamid - unter magnetischem Rühren hinzugetropft. Nach 20 Stunden bei 50 - 55° C wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum bei ca. 60° C abdestilliert und der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen. Die saure Lösung wurde neutralisiert und einige Stunden bei 0° C stehengelassen. Hierbei fiel nach Animpfen mit wenig Adenin der größte Teil der nicht-umgesetzten Base aus. Die Mutterlauge enthielt neben Resten an Adenin in der Hauptsache Adenosin und Adenylsäure, ferner noch Salz. Chromatographisch konnte die Adenylsäure in den Systemen Amylalkohol/5 %ig wässriges sek. Phosphat und Äthanol/1m Ammonacetat 5 : 2 in Adenosin-5'-phosphat und Adenosin-2':3'-cyclisches-phosphat getrennt werden.

Die weitere Abtrennung des Adenosins erfolgte in bekannter Weise durch fraktionierte Kristallisation oder nach W.E. Cohn (29) über eine Dowex-1-formiat-Säule, X 10, 200 - 400 mesh: Die Säule (12 x 2,5 cm) wird mit Ameisensäure/$NH_4OH$, pH 11,0 equilibriert, das Substanzgemisch daraufgegeben und das Adenosin mit Ameisensäure/$NH_4OH$, pH 10,2 eluiert. Die Isolierung des nicht-umgesetzten Adenins erfolgt danach bei

Ameisensäure/$NH_4OH$, pH 7, die Isolierung der Adenylsäure bei pH 2,6. Bei den verwandten Eluationslösungen muß die Formiatkonzentration stets 0,01 molar sein.

Die chromatographisch und durch anschließende Extinktionsmessung bestimmte Ausbeute an Adenosin, bezogen auf die eingesetzte Zuckermenge lag bei 20 - 30 %, die über die Säule erzielte Endausbeute um 20 %.

b) Aufarbeitung durch Fällung mit Chloroform. 500 mg Adenin wurden mit wenigen Tropfen konz. HCl in 25 ml Dimethylformamid gelöst, etwa 1 g PPE hinzugegeben und langsam innerhalb von 5 Stunden 100 mg D-Ribose - gelöst in 15 ml Dimethylformamid - unter Rühren hinzugetropft. Nach 20-stündiger Reaktionsdauer bei 50 - 55° C wurde das Reaktionsgemisch in Chloroform (ca. 200 ml) gegeben. Hierbei gingen der nicht-umgesetzte Ester und das Dimethylformamid in Lösung. Nach mehreren Stunden bei 0° C wurde das Chloroform vom ausgefallen Produkt (Adenin, Adenosin, Adenylsäure und Phosphate) abdekantiert und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Es konnten darauf die Phosphate mit $Ba(OH)_2$ ausgefällt und das Gemisch wie unter a) beschrieben weiter aufgearbeitet werden. Bei einer etwas größeren Säulenkapazität kann auf die $Ba(OH)_2$-Fällung auch verzichtet werden. Die Ausbeute betrug 15 - 20 %.

13.) Darstellung von 2'-Desoxy-Adenosin

9-N-(1'-[2'-Desoxy-ribosyl]-)-Adenin

1000 mg Adenin wurden mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml Dimethylformamid gelöst, etwa 3 g PPE hinzugegeben und 200 mg 2'-Desoxyribose, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, im Laufe von 10 Stunden unter magnetischem Rühren hinzugetropft. Nach 20 Stunden bei 50° C wurde das Dimethylformamid im Wasserstrahlvakuum bei 50 - 60° C abdestilliert, der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen und sofort neutralisiert. Durch Animpfen mit Adenin fiel bei 0° C ein großer Teil des überschüssigen Adenins aus. Die Abtrennung des 2'-Desoxy-Adenosins erfolgte Papierchromatographisch in den Systemen Amylalkohol/$H_2O$-gesättigt und Amylalkohol/5 %ige wässrige Lösung von sek. Phosphat. Die aus der Extinktion ermittelte Ausbeute betrug ca. 20 %, bezogen auf die eingesetzte Zuckermenge.

14.) Darstellung von 9-N-(N-Acethyl-glucosaminyl-)-Adenin

Die Reaktionsbedingungen und Aufarbeitungsmethoden waren die gleichen wie unter 13.) beschrieben. Die chromatographisch bestimmte Ausbeute betrug ca. 20 %, bezogen auf N-Acethyl-glucosamin.

15.) Darstellung von einem Adenin-fructosid

1000 mg Adenin wurden mit konz. HCl in 100 ml Dimethylformamid gelöst, ca. 3 g PPE hinzugegeben und 200 mg D-Fructose, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, im Laufe von 10 Stunden unter Rühren hinzugetropft. Nach ca. 24 Stunden bei 70 - 75° C wurde das Dimethylformamid abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und wie unter 13.) beschrieben aufgearbeitet. Die Ausbeute betrug nach der Extinktion ca. 10 %.

16.) Bestimmung der alkalischen Hyperchromie

Die Lösungen der Polynucleotide wurden mit 0,2-n-NaOH soweit verdünnt, bis ihre Extinktion bei 260 mμ im Zeiss-Spektralphotometer gut meßbar war. Darauf wurde die UV-Extinktionskurve von 220 - 290 mμ aufgenommen, und die Schliffreagenzgläser mit den Lösungen 24 Stunden auf 37° C gehalten. Hiernach wurde wieder die UV-Extinktionskurve aufgenommen. Nach 24 Stunden bei 20° C bzw. 1 Stunde bei 80° C war eine weitere Erhöhung der Extinktionskurven eingetreten. Die prozentuale Erhöhung des Maximums der Kurven wird als Hyperchromie bezeichnet.

17.) Polykondensation von Adenylsäure

a) Es wurden 500 mg Adenosin-2' und 3'-phosphat zusammen mit 100 mg $NaHCO_3$ in einer Achatreibschale fein zerrieben und in einem kleinen flachen Kolben mit ca. 8 g PPE versetzt. Der Reaktionsansatz wurde darauf unter langsamen Drehen des Kolbens 20 Stunden auf 50 - 60° C gehalten. Das viskose Gemisch war zunächst milchig weiß, wurde aber im Laufe der Reaktion opaleszierend durchsichtig. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz in Wasser gelöst, nach etwa 15 min mit $NaHCO_3$ neutralisiert und 48 Stunden gegen 6 x 10 Liter Wasser dialysiert. Die Ausbeute betrug nach der Gefriertrocknung 110 mg eines weißen schwach hygroskopischen Pulvers. Die Ausbeute an nicht-dialysablen Produkt beträgt demnach 24 %. Aus der Extinktion bei 260 mμ ergibt sich eine Ausbeute von 20 %. Der Phosphatgehalt betrug 13,8 %, die Sedimentationskonstante einer 1 %igen Lösung betrug 1,8, gemessen in der Unterschichtungszelle. Eine Verdünnungsreihe ergab den Wert $s_{20}$ ($c_g \rightarrow 0$) = 2,4 S. Die Diffusionskonstante war D = 10 x $10^{-7}$ ($cm^2$ x $sek^{-1}$). Die alkalische Hyperchromie mit 0,2 n-NaOH betrug 49 %.

b) Der gleiche Ansatz wie unter a) beschrieben, jedoch ohne $NaHCO_3$ im Reaktionsgemisch, ergab die folgenden Werte: Ausbeute aus der Extinktion 15 %; Phosphorgehalt 13,4 %; Sedimentationskonstante $S_{20}$ ($c_g \rightarrow 0$) = 2,2; Diffusionskonstante D = 11 x $10^{-7}$ ($cm^2$ x $sek^{-1}$). Die alkalische Hyperchromie betrug hier nur 9 %.

18.) Darstellung von Polyguanylsäure

Die Reaktionsansätze waren die gleichen wie unter 17.) beschrieben. Oft löste sich die Guanylsäure im Gegensatz zur Adenylsäure in dem PP-Ester nur schlecht. Bei Zugabe von ca. 4 ml Pyridin gelang es aber, eine klare Reaktionslösung zu erhalten. Die aus der Extinktion berechnete Ausbeute lag zwischen 10 und 20 %. Bei den Ansätzen ohne Pyridin lagen die Ausbeuten allgemein unter 10 %. Das Molekulargewicht der Polyguanylsäure betrug bei dem Pyridinansatz im Durchschnitt 28 000. Die weiteren Daten zur Charakterisierung sind: Phosphorgehalt 10,3; Sedimentationskonstante 2,9; alkalische Hyperchromie bis 34 %.

19.) Darstellung von Polycytidylsäure

Die Polykondensation wurde wie unter 17.) beschrieben durchgeführt. Auch hier brachten Ansätze mit ca. 4 ml Pyridin Ausbeutesteigerungen. Die Ausbeute ohne Pyridin betrug ca. 15 %, die mit Pyridin bis 20 %. Phosphorgehalt 12,1 %; Sedimentationskonstante ca. 2,0; alkalische Hyperchromie 23 %.

20.) Darstellung von Polyuridylsäure

Auch hier wurde die Kondensation wie bei der Polyadenylsäure durchgeführt. Ein größerer Unterschied zwischen den Ansätzen

mit und ohne Pyridin war hier nicht festzustellen. Das durchschnittliche Molekulargewicht betrug 50 000, die mittlere Ausbeute 20 %. Phosphorgehalt 12,0; Sedimentationskonstante 4,0; alkalische Hyperchromie bis 32 %.

21.) Darstellung des Poly-Desoxynucleotides Polythymidylsäure

500 mg Thymidylsäure wurden mit ca. 8 g PPE verrührt und in einem sich waagerecht langsam drehenden Kölbchen 6 Stunden bei 50° C gehalten. Darauf wurde der hell-gelbliche Ansatz in Wasser gegeben und nach 10 min mit $NaHCO_3$ auf einen pH-Wert von 3 - 4 eingestellt. Nach einer 2-tägigen Dialyse gegen 6 x 10 Liter Wasser wurde das Innendialysat gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 190 mg eines hell-gelblichen, krümeligen Produktes, entsprechend 40 %. Der Phosphorgehalt war 10,3 %; Sedimentationskonstante 2,3; alkalische Hyperchromie 50 %.

## IV. Zusammenfassung

Um genauere Unterlagen über die Darstellungsmöglichkeit von Apurinsäuren zu erhalten, wurden zunächst die bisher nicht bekannten Hydrolysekonstanten der Purin- und Phosphorsäurediester-Spaltung bestimmt. Die Purinabspaltung wurde chromatographisch, die Spaltung der Phosphatbrücken durch potentiometrische Titration der entstehenden sekundären Phosphatgruppen bestimmt. Die Hydrolysengeschwindigkeit der Phosphorsäurediester-Bindung ist bei der RNS und DNS fast gleich, dagegen erfolgt die Purinabspaltung bei der DNS 650 mal schneller als bei der RNS. Beide Hydrolysereaktionen stellen protonenkatalysierte Spaltungen dar. Die Purinabspaltung und die Kettenspaltung sind im gleichen Maße von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängig. Die Ausbeute an Apurinsäure ist daher von pH-Wert unabhängig.

Ausgehend von Apurinsäuren gelang die Synthese von Nucleinsäuren durch den Einbau von $C^{14}$-markierten heterocyclischen Basen. Die Bildung der N-glycosidischen Bindung erfolgte durch die Aktivierung der freien Aldehydgruppen mit Polyphosphorsäure-äthylester (PPE). Mit Adenin als Base gelang es, die freien Aldehydgruppen zu 100 % umzusetzen. Hierbei entsteht eine neuartige Nucleinsäure, die außer den Pyrimidinen nur Adenin enthält. Die synthetisierte Nucleinsäure wird durch DNase und Schlangengift-Diesterase gespalten.

Unter den Spaltprodukten tritt 2'-Desoxy-Adenosin auf, das mit dem natürlichen Nucleosid identisch ist. Es handelt sich also um eine β 1'→ 9 N-glycosidische Verknüpfung. Ähnliche Versuche wurden mit Guanin, Uracil und Thymin durchgeführt. Die Pyrimidine reagieren langsamer als die Purine.

Um die Bildung von N-Glycosiden mit Polyphosphorsäure-äthylester näher untersuchen zu können, wurden verschiedene Zucker mit heterocyclischen Basen umgesetzt. Aus D-Ribose und Adenin konnte in guter Ausbeute in einem Reaktionsschritt Adenosin synthetisiert werden. Die Konfiguration der N-glycosidischen Bindung entsprach der von natürlichem Adenosin. Weitere N-Glycoside wurden aus 2'-Desoxyribose, Fructose und N-Acethylglucosamin hergestellt. Alle Zucker konnten ohne vorherigen Schutz der OH-Gruppen umgesetzt werden.

Mit Polyphosphorsäure-äthylester können auch Oxy-gruppen der Phosphorsäure aktiviert und mit anderen Oxyverbindungen verestert werden. Durch Erwärmen von Adenylsäure in Gegenwart von PPE entstand eine hochmolekulare Polyadenylsäure mit einem mittleren Molekulargewicht von 21 000. Der hochmolekulare Charakter der Substanz wurde durch elektronen-mikroskopische Aufnahmen und durch die Bestimmung der Hyperchromie bestätigt. Die enzymatischen Abbauversuche sprechen dafür, daß bei der Kondensation vorwiegend die natürlichen 3'-5'-Bindungen entstehen. Analog wurden durch Polykondensation von Guanylsäure, Cytidylsäure, Uridylsäure und Thy-

midylsäure die entsprechenden Polymeren dargestellt. Aus Mischungen verschiedener Nucleotide entstanden Mischpolymerisate. Enzymatische Abbauversuche und die Bildung von Doppelspiralen aus komplementären Nucleotidsträngen sprechen dafür, daß die synthetisierten Produkte den natürlichen zumindestens sehr ähnlich sind. Damit wurden zum ersten Male auf chemischem Wege hochmolekulare Nucleinsäuren hergestellt.

## V. Literaturverzeichnis


1. H.Schuster, G.Schramm:
   Z.f.Naturforsch. 13b, 697 (1958)

2. A. Gierer, K.W.Mundry:
   Nature 182, 1457 (1958)

3. H.Schuster:
   J.Mol.Biology 3, 447 (1961)

4. M.J.Bessman, I.R.Lehman, E.S.Simms u.A.Kornberg:
   J.Biol.Chemistry 233, 171 (1958)

5. M.Grunberg-Manago u.S.Ochoa:
   J.Amer.chem.Soc. 77, 3165 (1955)

6. S.B.Weiss u. T.Nakamoto:
   J.Biol.Chem. 236, PC 18 (1961)

7. E.P.Geiduschek, T.Nakamoto u. S.B.Weiss:
   Proc.Natl.Acad.Sci. 47, 1400; 1405 (1961)

8. A.Stevens:
   J.Biol.Chem. 236, PC 43 (1961)

9. D.P.Burma, H.Kröger, S.Ochoa, R.C.Warner u. J.D.Weill:
   Proc.Natl.Acad.Sci. 47, 749 (1961)

10. G.Schramm u. H.Wissmann:
    Chem.Berichte 91, 1073 (1958)

11. E.Chargaff u. J.N.Davidson:
    The Nucleic Acids, Vol.I; S. 192;
    Acad.Press. New York N.Y.

12. ebenda S 196

13. Ch.Tamm, M.E.Hodes u.E.Chargaff:
J.Biol.Chem. 195, 49 (1952)

14. E.Bautz u. E.Freese:
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 47, 540 (1961)

15. A.Gierer:
Z.f.Naturforsch. 13b, 485 (1958)

16. W.Pollmann u. G.Schramm:
Z.f.Naturforsch. 16b, 673 (1961)

17. M. MacLeod u. R. Robinson:
Biochem.J. 23, 517 (1929)

18. E.Müller:
Neuere Anschauungen der Org.Chemie:
Springer Verlag 1957; S. 221

19. H.Venner:
Chem.Berichte 93, 140 (1961)

20. A.M.Michelson:
Ann.Rev.Biochem. 30, 133 (1961)

21. R.P.Linstead et al.:
J.chem.Soc. 1953, 1211

22. "The Enzymes" Edited by
P.L.Boyer, H.Lardy u. K.Myrbäck, Vol. 5;
Academic Press, New York and London 1961 S. 86

23. ebenda: S. 123

24. ebenda: S. 95

25. C.Tamm, H.S.Shapiro u. E.Chargaff:
J.Biol.Chem. 199, 313 (1952)

26. J.M.Gulland u. E.R.Holiday:
J.chem.Soc. 1936, 765

27. E.L.Jackson:
Organic Reactions, Vol.2, 341 New York (1944)

28. G.Schramm, H.Grötsch u. W.Pollmann:
Angew.Chemie 74, (1962) S.53

sowie: Angew.Chemie, International Edition Vol. 1, Nr. 1, S. 1 (1962)

29. W.E.Cohn:
J.Amer.chem.Soc. 72, 1471 (1950)

30. A.M.Michelson:
J.chem.Soc. 1959, 1371, 3655

31. A.Todd u. A.M.Michelson:
J.chem.Soc. 1955, 2632

32. H.G.Khorana, G.M.Tener, R.Markham u. E.H.Pol:
J.Amer.chem.Soc. 80, 6223 (1958)

33. F.Cramer:
Angew.Chemie 73, 49 (1961)

F.Cramer u. R.Wittmann:
Chem.Berichte 94, 322 (1961)

34. A.Gierer:
Z.f.Naturforsch. 13b, 787 (1958)

35. G.Felsenfeld, D.R.Davies u. A.Rich:
J.Amer.chem.Soc. 79, 2023 (1957)

36. J.D.Watson u. F.H.C.Crick:
Nature 171, 737 (1953)

37. A.M.Chestfield, K.C.Smith u. F.W.Allan:
J.Biol.Chem. 216, 185 (1955)

38. S.Zamenhof:
Methods in Enzymology III, 689

39. Z.Dische:
Z.Mikrochem. 8, 4 (1930)

40. R.Markham u. J.D.Smith:
Biochem.J. 46, 509 (1950)

41. K.Langheld:
Berichte dtsch.chem.Gesellsch. 44, 2078 (1911)

# Lebenslauf

Am 22. 8. 1935 wurde ich, Wolfgang P o l l m a n n , als Sohn des Ingenieurs Fritz Pollmann und seiner Frau Edith Pollmann, geb. Mulisch in Bielefeld geboren.

In Schwarzenbek/Lauenburg besuchte ich vier Jahre die Volksschule und anschließend die Oberschule in Reinbek/ Hamburg und Bückeburg/Hannover. Hier erhielt ich Ostern 1955 unter Befreiung von der mündlichen Prüfung das Reifezeugnis.

Im Sommersemester 1955 begann ich mein Hochschulstudium an der Universität Freiburg/Br. in der Fachrichtung Chemie. Im Mai 1958 bestand ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung. Zum Wintersemester 1959 habe ich mein Studium an der Universität Tübingen fortgesetzt und bestand im Januar 1961 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung. Meine Diplom- und Doktorarbeit habe ich bei Prof.Dr.G. Schramm am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen gemacht.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten: M. Barner, G. Bähr, G. Brauer, Frhr.W.v. Engelhardt, W. Gentner, H. Griesebach, H. Hellmann, E. Husemann, J. Jander, W. Kast, H. Krüger, A. Lüttringhaus, W. Maier, R. Mecke, G. Möllenstedt, E. Müller, W. Rudorff, Th. Schmidt, G. Schramm, K. Sommermeyer, H. Staudinger, W.E. Tröger, K. Wallenfels, W. Weiskirchner und O. Westphal.